
DESARROLLO DE VACUNAS FRENTE A LA MALARIA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Autor: Taranu, Alexandru Mirel

Directores:

Mesa Valle, Concepción María

Garrido Cárdenas, José Antonio

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y GEOLOGÍA

ÁREA DE PARASITOLOGÍA



Grado en Biotecnología

Junio, 2020

ÍNDICE

| | |
|-----------------------------------------------------------|-----------|
| 1. RESUMEN/ABSTRACT | 2 |
| 1.1. Resumen..... | 2 |
| 1.2. Abstract | 2 |
| 2. OBJETIVOS | 3 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 4. EL PARÁSITO | 5 |
| 4.1. Clasificación taxonómica | 5 |
| 4.2. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> | 5 |
| 5. LA ENFERMEDAD | 6 |
| 5.1. Sintomatología | 6 |
| 5.2. Epidemiología | 7 |
| 5.3. Diagnóstico | 8 |
| 5.4. Prevención y tratamiento | 10 |
| 5.4.1. Lucha antivectorial | 10 |
| 5.4.2. Fármacos antipalúdicos | 11 |
| 5.4.3. Vacunas antimaláricas | 15 |
| 6. VACUNAS FRENTE A LA MALARIA | 17 |
| 6.1. Vacunas preeritrocíticas | 18 |
| 6.1.1. Vacunas de subunidades..... | 18 |
| 6.1.2. Vacunas de esporozoitos enteros | 20 |
| 6.2. Vacunas frente a la fase hepática | 21 |
| 6.3. Vacunas frente a la fase hemática | 22 |
| 6.4. Vacunas frente a las fases sexuales | 24 |
| 6.5. Vacunas frente a <i>P. vivax</i> | 25 |
| 6.6. Futuro del desarrollo de vacunas antimaláricas | 26 |
| 7. CONCLUSIONES | 27 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA..... | 28 |

1. RESUMEN/ABSTRACT

1.1. Resumen

La malaria es la enfermedad parasitaria con mayor morbilidad y mortalidad en los seres humanos. La erradicación de esta enfermedad, causada por parásitos del género *Plasmodium*, ha sido uno de los objetivos primordiales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) durante décadas. Los esfuerzos por combatirla han llevado al desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, prevención y tratamiento, que han contribuido enormemente en la disminución de la mortalidad e incluso en la erradicación de la enfermedad en ciertas regiones. No obstante, la malaria sigue causando estragos en numerosos países en vías de desarrollo. Actualmente, el principal objetivo en la lucha contra la malaria es el desarrollo de una vacuna eficaz y segura que contribuya al cumplimiento de las metas que la OMS ha establecido para llevar a cabo la erradicación de esta enfermedad. Así, existen numerosas vacunas en proceso de desarrollo, algunas de ellas encontrándose en fase clínica y aportando resultados muy prometedores para el futuro.

1.2. Abstract

Malaria is the parasitic disease with the highest morbidity and mortality in humans. The eradication of the diseases caused by *Plasmodium* parasites has been one of the World Health Organization's (WHO) main objectives during decades. The efforts carried out to fight this disease have led to the development of new diagnostic, prevention and treatment methods, which have contributed in highly reducing the disease's mortality and in eliminating it from certain regions. However, malaria is still a burden in developing countries. At the present time, the main goal for fighting malaria is the development of a safe and effective vaccine, that will contribute to the achievement of the goals set by the WHO for the eradication of this disease. Thus, there is a high number of vaccines being developed nowadays, some of which are in clinical phase, providing results that seem very promising for the future.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es llevar a cabo una revisión bibliográfica de la literatura existente en torno a las principales líneas de investigación sobre el desarrollo de una vacuna contra la malaria. Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Conocer la situación actual de la malaria a nivel mundial.
2. Evaluar las estrategias de lucha frente a la malaria.
3. Analizar las líneas de investigación desarrolladas en la búsqueda de una vacuna eficaz frente a la malaria.

3. INTRODUCCIÓN

La malaria, o paludismo, es una enfermedad infecciosa ocasionada por protozoos parásitos del género *Plasmodium*, transmitida a los seres humanos por las picaduras de mosquitos hembra del género *Anopheles*.

Según el último informe sobre el paludismo emitido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization, 2019b), se estima que en el año 2018 se dieron unos 228 millones de casos de malaria en todo el mundo, provocando alrededor de 405 000 muertes. La mayoría de estos casos ocurrieron en la Región de África (93%), mientras que un 3,4% de casos fueron observados en la Región de Asia Sudoriental, y un 2,1% en la Región del Mediterráneo Oriental. Cabe destacar que más de la mitad de todos los casos se dio en solo seis países ([Figura 1](#)): Nigeria (25%), República Democrática del Congo (12%), Uganda (5%), Mozambique (4%), Costa de Marfil (4%) y Níger (4%). El grupo más vulnerable lo conforman los menores de cinco años, que en el año 2018 representaban un 67% de las muertes causadas por malaria en todo el mundo.

El género *Plasmodium* es un grupo taxonómico muy amplio y diverso, constituido por más de 175 especies de parásitos que infectan aves, reptiles, roedores, simios y al ser humano (Chavatte et al., 2007). Las principales especies de *Plasmodium* que infectan al ser humano son: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri* y *P. knowlesi*. De todas estas, *P. falciparum* y *P. vivax* son las de más amplia distribución geográfica. *P. falciparum* es responsable de la forma más grave de la enfermedad y, en los últimos años, *P. vivax* está también provocando casos de malaria severa (Naing et al., 2014). En 2018, *P. falciparum* originó el 99,7% de casos en la Región de África, el 50% de casos en la Región de Asia Sudoriental, el 71% de casos en el Mediterráneo Oriental y el 65% de casos en el Pacífico Occidental. *P. vivax*, por otra parte, predomina en la Región de las Américas, donde dio lugar al 75% de casos de malaria.

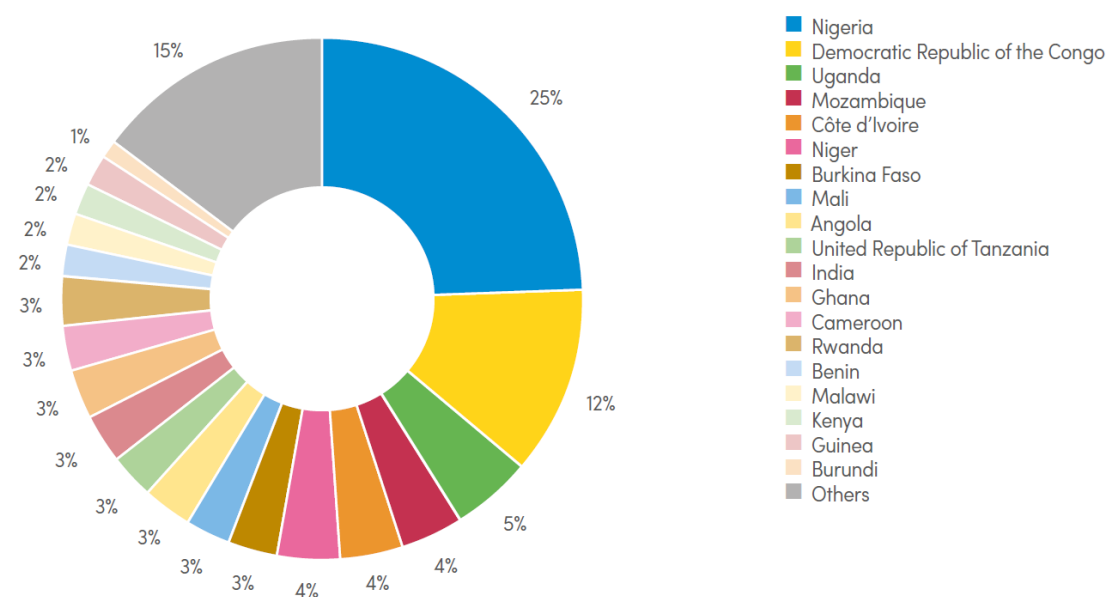


Figura 1. Representación del porcentaje de infectados en cada país sobre el número total de infectados (World Health Organization, 2019b).

En mayo de 2015 se aprobó la *Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria 2016-2030*; se trata de un marco técnico cuyo objetivo es orientar a los programas nacionales y regionales en su lucha contra la enfermedad. Se fijaron las siguientes metas a nivel mundial: disminuir la incidencia de la malaria al menos en un 90% para el año 2030; disminuir la mortalidad por malaria al menos en un 90% para el año 2030; erradicar la enfermedad en al menos 35 países para el año 2030; impedir la reaparición de la malaria en los países en los que ha sido erradicada. Para lograr estas metas, se fijaron tres pilares básicos:

- Conseguir el acceso universal a la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad.
- Acelerar los esfuerzos para conseguir la eliminación y obtener el estado libre de malaria.
- Convertir la vigilancia en una intervención básica.

Se establecieron, también, dos elementos de apoyo:

- Aprovechar las innovaciones y promover la investigación.
- Fortalecer el entorno propicio.

Existen además programas internacionales de lucha contra la malaria, como RBM (*Roll Back Malaria*) o MIM (Iniciativa Multilateral sobre la Malaria), los cuales han contribuido enormemente a la reducción de la mortalidad de la enfermedad (Girard et al., 2007).

4. EL PARÁSITO

4.1. Clasificación taxonómica

Plasmodium es un género de protistas del filo *Apicomplexa*, clase *Aconoidasida*, orden *Haemosporida* y familia *Plasmodiidae* del que se conocen más de 175 especies.

4.2. Ciclo de vida de *Plasmodium*

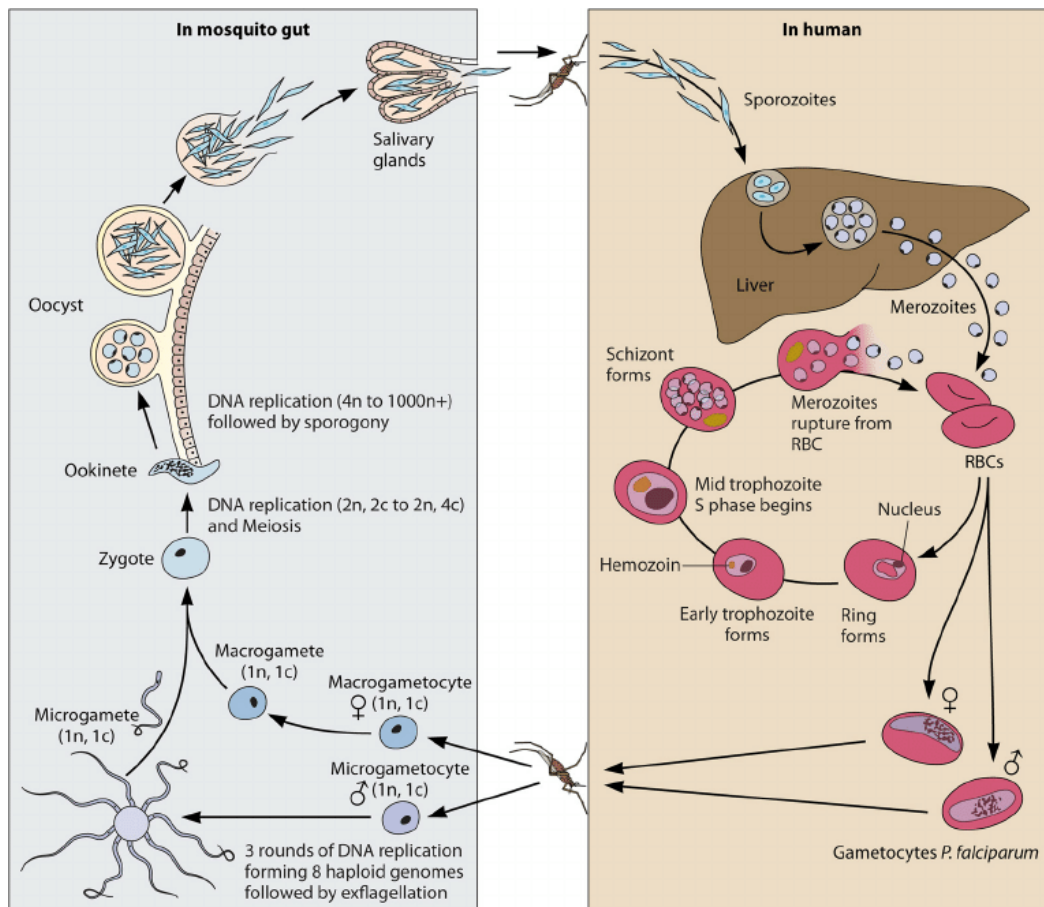


Figura 2. Ciclo de vida de *Plasmodium* (Lee et al., 2014)

Existen numerosas especies de *Plasmodium* y todas ellas tienen ciclos de vida similares, con un artrópodo como vector y especificidad por un hospedador vertebrado. Se trata de un ciclo complejo (Figura 2); la reproducción sexual tiene lugar en mosquitos del género *Anopheles*, donde el parásito se encuentra en forma diploide, mientras que la reproducción asexual ocurre en el hospedador vertebrado. En humanos, el parásito tiene dos estadios multiplicativos: uno en los hepatocitos (fase exoeritrocítica) y otro en los eritrocitos (fase intraeritrocítica) (Garrido-Cardenas et al., 2019).

El ciclo comienza con la picadura de un mosquito hembra infectado del género *Anopheles*, el cual inocula esporozoitos en el huésped vertebrado al alimentarse. Una sola picadura puede transferir entre 20 y 200 esporozoitos (Gomes et al., 2016; Itoe et al., 2014). Estos permanecen en la dermis un

máximo de tres horas, hasta que encuentran un capilar y entran al torrente sanguíneo, a través del cual migran al hígado (Acharya et al., 2017).

Los esporozoitos invaden las células hepáticas y forman esquizontes que liberan miles de merozoitos (esquizogonia), proceso que dura entre dos y catorce días dependiendo de la especie de *Plasmodium* (Hall et al., 2005). En las infecciones causadas por *P. vivax* y *P. ovale* se forman además hipnozoitos, formas latentes del parásito que permanecen en las células hepáticas y son responsables de episodios reincidentes de la enfermedad, los cuales pueden ocurrir semanas, meses o incluso años más tarde (Markus, 2011).

Después de la esquizogonia, los merozoitos son liberados al torrente sanguíneo, donde invaden los eritrocitos. Comienzan nuevos ciclos de esquizogonia, convirtiéndose primero en trofozoítos y luego en esquizontes. Los esquizontes maduros producen merozoitos capaces de invadir más glóbulos rojos; esto se denomina ciclo eritrocítico y se repite de forma indefinida (Gilson & Crabb, 2009; Silvie et al., 2008). Además, en esta etapa empiezan a manifestarse los síntomas de la enfermedad.

Se ha observado que cada ciclo eritrocítico tiene una duración aproximada de 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. ovale*, 24 horas para *P. knowlesi*, y 72 horas para *P. malariae*. Tras numerosos ciclos eritrocíticos y estimulados por el sistema inmune del huésped, la fiebre e incluso la terapia antimalarial, algunos merozoitos dan lugar a gametocitos masculinos y femeninos -estas son las formas que pasan al mosquito del género *Anopheles* cuando absorbe la sangre del hospedador (Su et al., 2019)-.

Cuando un mosquito hembra del género *Anopheles* se alimenta de la sangre de un individuo infectado, es inoculado con estos gametocitos, que llegan a su intestino medio, donde se diferencian en gametos masculinos y femeninos y se fusionan para producir cigotos. Los cigotos maduran y se transforman en oocinetos, los cuales atraviesan la membrana peritrófica y el epitelio intestinal y se diferencian en ooquistes que se fijan sobre la superficie exterior del intestino medio (Barillas-Mury & Kumar, 2005). Los ooquistes estallan liberando miles de esporozoitos al hemocele, los cuales invaden finalmente las glándulas salivales. Los parásitos alcanzan un nuevo huésped cuando el mosquito se alimenta de la sangre de un nuevo hospedador.

5. LA ENFERMEDAD

5.1. Sintomatología

Los síntomas de la enfermedad comienzan a manifestarse durante la fase intraeritrocítica de la parasitosis y varían según el paciente y la especie de *Plasmodium* responsable de la infección. Comúnmente la malaria se clasifica en tres tipos: asintomática, leve y severa (World Health Organization, 2014). *P. falciparum* es la especie responsable de la forma severa de la enfermedad, mientras que *P. vivax* suele causar infecciones más leves. Sin embargo, en los últimos años, se han observado casos de malaria severa provocada por *P. vivax* (Naing et al., 2014). También son frecuentes las coinfecciones (Zimmerman et al., 2004); infecciones mixtas por *P. falciparum* y *P. vivax* (Ginouves et al., 2015; Imwong et al., 2011) o *P. ovale curtisi* y *P. ovale wallikeri* con *P. malariae* han sido detectadas en zonas donde ambas especies prevalecen (Dinko et al., 2013; Fançon y et al., 2012).

Una pequeña fracción de los afectados progresa hacia la malaria severa, con el desarrollo de un coma potencialmente mortal (malaria cerebral), edema pulmonar, fallo renal agudo, anemia severa,

acidosis, hipoglucemia y/o hemorragia (Trampuz et al., 2003). Cabe recalcar que la malaria severa es normalmente causada por *P. falciparum* (Seydel et al., 2015), aunque puede ser causada por *P. vivax* (Arnott et al., 2012) o *P. knowlesi* (Bartoloni & Zammarchi, 2012) con mucha menos frecuencia.

La malaria leve tiene un rango sintomático bastante amplio e inicialmente similar al del resfriado común: fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, mareos, mialgia, dolor de huesos y articulaciones, tos, debilidad, náuseas, vómitos y diarrea (Su et al., 2019). Esta forma de la enfermedad puede ser ocasionada por cualquier especie de *Plasmodium* y depende, en gran medida, del grado de exposición previa (Bartoloni & Zammarchi, 2012).

La enfermedad se considera asintomática cuando hay presencia de parásitos en el torrente sanguíneo, pero no se manifiestan los síntomas; en estos casos no se administra ningún tipo de tratamiento (Lindblade et al., 2013; Phillips et al., 2017). La malaria asintomática o malaria crónica (I. Chen et al., 2016) puede perdurar durante periodos largos de tiempo (Bousema et al., 2014), por lo que los individuos afectados se consideran importantes reservorios de la enfermedad, contribuyendo a su transmisión y dificultando su control.

5.2. Epidemiología

Tradicionalmente se conocían cuatro especies de *Plasmodium* capaces de infectar al ser humano: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*. Esta última contaba con dos subespecies: *P. ovale curtisi* y *P. ovale wallikeri*. Sin embargo, Ansari et al. (2016) demostraron que se trataba de dos especies distintas. En adición a estas, *P. knowlesi* ha sido recientemente reconocida como una nueva especie causante del paludismo. Esta especie fue identificada en 1932 como parásito natural de los macacos en el Sudeste Asiático, y el primer caso de parasitosis humana se registró en 1965 (Garrido-Cardenas et al., 2019). Décadas más tarde, Singh et al. (2004) estudiaron numerosos casos de malaria ocasionada por *P. knowlesi* en la isla de Borneo (Malasia). En la actualidad es considerada una especie emergente en el continente asiático (Herdiana et al., 2016), donde se han registrado numerosos casos de infecciones en humanos en la última década (N. J. White, 2008; William et al., 2013; Yusof et al., 2014). Además, es el tipo más común de malaria en Malasia, siendo la población indígena y los turistas los más afectados por la enfermedad (Barber et al., 2017; Millar & Cox-Singh, 2015). Existe la posibilidad de que el número real de casos producidos por *P. knowlesi* sea mayor de lo estimado, debido a que las fases hemáticas de *P. knowlesi* son muy similares morfológicamente a las de *P. malariae*, lo que podría haber provocado diagnósticos erróneos. Esto puede ocurrir si el diagnóstico es exclusivamente microscópico y se puede evitar empleando técnicas de identificación molecular (Ramasamy, 2014).

Se han detectado, además, casos de malaria zoonótica, transmitida al ser humano a través de ciertas especies de simios. En Sudamérica se han identificado dos especies con esta capacidad: *P. simium*, prácticamente indistinguible de *P. vivax*; y *P. brasilianum*, indistinguible de *P. malariae*. *P. simium* es un parásito natural de simios y se encuentra en el bosque atlántico del sur y sudeste de Brasil. El primer caso de infección de un ser humano se registró en Brasil (Deane, 1992). Posteriormente, entre 2006 y 2016, se han detectado varios casos en los valles del bosque atlántico (Siqueira et al., 2016). Más tarde, Brasil et al. (2017) informaron de un brote de malaria en el bosque atlántico del estado de Río de Janeiro durante 2015 y 2016. Los datos parecen indicar que estos casos se deben a la invasión por parte del hombre de los hábitats naturales de los simios. Por otra parte, *P. brasilianum* se identificó en 1908 como un plasmodio que infecta naturalmente a varias especies de simios (Guimarães et al., 2012). Los primeros casos de infecciones por *P. brasilianum* en el hombre se dieron en las regiones amazónicas y en los bosques atlánticos de Sudamérica (Lalremruata et al., 2015).

P. cynomolgi es otro parásito de primates encontrado en el continente asiático, cuyos hospedadores naturales son los macacos. En 2014 se registró el primer caso de parasitosis en el ser humano, en la península malaya, donde estos simios presentan una amplia distribución (Ta et al., 2014). Existen, además, casos recientes de malaria causada por *P. cynomolgi* en Camboya y en el Sudeste Asiático (Hartmeyer et al., 2019; Imwong et al., 2019).

Estos casos de zoonosis suponen un problema considerable para la lucha mundial contra el paludismo, pues dificultan el control de la enfermedad.

Actualmente se conocen unas 500 especies de mosquitos *Anopheles*, y alrededor de 60 son capaces de transmitir la malaria al ser humano (Roux & Robert, 2019). Los dos principales vectores son conocidos como *Anopheles gambiae* y *Anopheles funestus*, el primero corresponde a un complejo de especies y el segundo probablemente también. *Anopheles gambiae* se compone de siete especies morfológicamente indistinguibles, siendo *An. gambiae* y *An. arabiensis* las más importantes (Hay et al., 2010; Sinka et al., 2010).

Los principales vectores tienen unos ciclos de vida similares (Merritt, 1993). Los mosquitos hembra emergen y se aparean, y necesitan alimentarse de sangre una o varias veces para la maduración de los huevos. La mayoría de las especies de *Anopheles* se alimentan de varios hospedadores potenciales; la razón por la que algunos vectores competentes no son considerados importantes es que los humanos suponen una pequeña fracción de su dieta. *An. gambiae* y *An. funestus* (en menor medida), sin embargo, están relativamente especializadas en picar a los seres humanos (antropofilia), por lo que se les da mayor importancia. Tanto *An. gambiae* como *An. funestus* son especies endofágicas (se alimentan en interiores) y endofílicas (habitan interiores), y suelen picar durante la noche.

Después de alimentarse de sangre, los mosquitos vuelan hacia los sitios de cría para llevar a cabo la oviposición. Las larvas de *Anopheles* son acuáticas y se crían en diferentes hábitats, dependiendo de la especie. En el caso de la especie *An. gambiae*, las larvas se crían en cuerpos efímeros de agua, como las acumulaciones de agua en las marcas dejadas por animales o vehículos. Especies relacionadas ponen sus huevos en aguas corrientes o en arrozales. Miembros menos comunes del complejo de *An. gambiae* se especializan en agua salobre o manantiales salados. Como consecuencia de su biología, el número de mosquitos y la fuerza infectiva están altamente influenciados por los patrones de lluvia estacional (Godfray, 2013). Por lo que respecta a *An. funestus*, sus larvas se crían en cuerpos de agua fresca con vegetación emergente, como pantanos, estanques de agua o lagos.

5.3. Diagnóstico

El diagnóstico rápido y preciso de la enfermedad es crítico para llevar a cabo un control efectivo. Los retrasos en el diagnóstico y tratamiento de la malaria son las principales causas de su mortalidad en numerosos países. El diagnóstico de la malaria involucra la identificación de parásitos y/o antígenos en las muestras de sangre de los pacientes sospechosos. La eficacia del diagnóstico puede verse afectada por numerosos factores: la especie de *Plasmodium* responsable de la infección, las diferentes etapas del ciclo eritrocítico del parásito, el endemismo de las distintas especies y la interrelación entre los niveles de transmisión, la migración, la inmunidad y los síntomas (Tangpukdee et al., 2009).

El método menos costoso y más practicado para diagnosticar la malaria es el denominado diagnóstico clínico (Wongsrichanalai et al., 2007), que se basa en la identificación de los síntomas. Este método presenta una baja especificidad debido al solapamiento entre los síntomas de la malaria con los síntomas de otras enfermedades tropicales comunes, lo cual promueve el uso indiscriminado de

fármacos antipalúdicos para el tratamiento de condiciones febriles en áreas endémicas (McMorrow et al., 2008; Mwangi et al., 2005; Reyburn et al., 2004). La Atención Integrada a las Enfermedades Prevalentes de la Infancia (AIEPI) ha proporcionado algoritmos clínicos para el manejo y el diagnóstico de enfermedades comunes en infantes por parte de personal mínimamente cualificado en los países en vías de desarrollo. Ciertos estudios muestran que el uso de estos algoritmos ha dado lugar a un 30% de sobrediagnóstico de la enfermedad (Tarimo et al., 2001).

En el laboratorio, la malaria se diagnostica utilizando diferentes técnicas, como la microscopía (Ngasala et al., 2008), el método QBC (*Quantitative Buffy Coat*, capa leucocítica cuantitativa) (Bhandari et al., 2008), las pruebas de diagnóstico rápido, los ensayos de inmunofluorescencia (IFA) y la PCR u otras técnicas de biología molecular (Vo et al., 2007).

Tradicionalmente y en la mayoría de casos, la malaria se diagnostica por visualización al microscopio de muestras de sangre teñidas utilizando los métodos de Giemsa, Wright o Field (Warhurst & Williams, 1996). La microscopía se ha convertido en la técnica estándar para el diagnóstico del paludismo en el laboratorio (Bharti et al., 2007), lo cual se debe principalmente a su simplicidad, su reducido coste y la posibilidad de identificar la especie causante de la infección. La principal desventaja de la microscopía es que su sensibilidad es relativamente baja cuando los niveles de parásitos en sangre son bajos (D. Payne, 1988). Además, es complicado distinguir entre especies muy parecidas morfológicamente.

El método QBC fue diseñado con el objeto de mejorar la detección por microscopía y simplificar el diagnóstico de la malaria (Clendennen et al., 1995). Se basa en la tinción del ADN del parásito con pigmentos fluorescentes y su posterior detección con un microscopio de fluorescencia. Esta técnica incrementa la sensibilidad a *P. falciparum*, pero reduce la sensibilidad para las otras especies y disminuye la especificidad al teñir el ADN de los leucocitos (Moody, 2002). Es el método de preferencia para estudios epidemiológicos en poblaciones asintomáticas de zonas endémicas por su alta sensibilidad incluso a niveles bajos de parasitemia (Ochola et al., 2006).

Desde que la OMS reconoció la urgente necesidad de disponer de nuevos métodos de diagnóstico más sencillos, rápidos, precisos y económicos, se han desarrollado numerosas técnicas que se conocen con el nombre de pruebas de diagnóstico rápido (*RDTs, Rapid Diagnostic Tests*). Se trata de técnicas rápidas y sencillas, que no requieren electricidad ni material de laboratorio (Bell et al., 2006). Existen numerosas RDTs comerciales de diferentes fabricantes, y todas se basan en el mismo principio: la detección de antígenos en una muestra de sangre que fluye a través de una membrana que contiene anticuerpos específicos para la malaria. La mayoría son capaces de distinguir las infecciones por *P. falciparum*, aunque existen algunos que pueden detectar *P. vivax* (Kim et al., 2008; T. S. Park et al., 2006; Sei et al., 2008) e incluso *P. knowlesi* (McCutchan et al., 2008). Los RDTs conforman un método valioso para la detección de la malaria; sin embargo, han de usarse en conjunto con otros métodos para la confirmación de los resultados, la caracterización de la infección y la monitorización del tratamiento.

También es posible llevar a cabo la detección mediante inmunofluorescencia (*IFA, Immunofluorescence Assay*) (She et al., 2007), con una alta sensibilidad y una alta especificidad. Sin embargo, es una técnica lenta, subjetiva, no automatizable y requiere tanto equipos avanzados como personal cualificado, por lo que su uso está prácticamente restringido a estudios epidemiológicos (Sulzer et al., 1969).

Los últimos avances en técnicas de biología molecular, como la PCR, la amplificación isotérmica mediada por bucle, los chips de ADN, la espectrometría de masas y la citometría de flujo han permitido la caracterización de *Plasmodium* y están generando nuevas estrategias para el diagnóstico de la malaria.

Las técnicas basadas en la PCR han demostrado ser de las más específicas y sensibles, particularmente para el diagnóstico en condiciones de bajos niveles de parasitemia o infecciones mixtas (Morassin et al., 2002). Se puede emplear para la detección de parásitos farmacorresistentes, infecciones mixtas y se puede automatizar para el procesamiento de un gran número de muestras (Hawkes & Kain, 2007; Swan et al., 2005). Técnicas de PCR modificadas (PCR anidada, PCR en tiempo real y PCR con transcriptasa inversa) han mostrado ser eficaces para la determinación precisa de la especie (Imwong et al., 2008; Mens et al., 2006; Mlambo et al., 2008; Swan et al., 2005). Aun así, las técnicas basadas en la PCR son muy complejas, costosas y requieren personal cualificado, por lo que no están implementadas en los países en vías de desarrollo (Mens et al., 2008).

Otras múltiples técnicas de diagnóstico han sido introducidas a lo largo de los años. Algunas de ellas están disponibles comercialmente, como las pruebas ELISA (J. W. Park et al., 2008), la aglutinación en látex (Polpanich et al., 2007) y el cultivo de parásitos (Chotivanich et al., 2001). Sin embargo, las técnicas moleculares, las técnicas serológicas y el cultivo de parásitos, aunque son muy útiles en los laboratorios de investigación, no son métodos prácticos para el diagnóstico rutinario de la malaria.

5.4. Prevención y tratamiento

5.4.1. Lucha antivectorial

El medio más efectivo para la reducción de la transmisión de la malaria es la lucha antivectorial. Las principales estrategias de lucha antivectorial recomendadas por la OMS son el uso de mosquiteras tratadas con insecticidas de larga duración (MTILD o *LLINs*, *Long-lasting Insecticidal Nets*) y la fumigación de interiores con insecticidas de acción residual (FIAR o *IRS*, *Indoor Residual Spraying*) (World Health Organization, 2019b).

Las MTILD son mosquiteras que se tratan con insecticidas químicos durante su fabricación, y están diseñadas de forma que se mantienen eficaces frente a los vectores maláricos durante un mínimo de tres años. Hasta el año 2007, la OMS había dirigido la distribución de mosquiteras tratadas solo a mujeres embarazadas, niños e individuos seropositivos. Sin embargo, a partir del 2007, han impulsado el acceso universal en las áreas endémicas, con el objetivo de hacer disponible una mosquitera por cada dos individuos. El uso de las MTILD ha demostrado ser una estrategia altamente efectiva para la prevención de la malaria y ha contribuido a una reducción significativa de la morbilidad (cantidad de individuos afectados en relación con el total de la población) y la mortalidad (cantidad de individuos que fallecen en relación con el total de individuos afectados) de la enfermedad en los últimos años (De Sousa et al., 2019).

Otra estrategia de lucha antivectorial es la denominada FIAR, que implica la aplicación de productos insecticidas sobre las superficies interiores (paredes y techos) de hogares, edificios públicos y refugios animales en áreas donde existe riesgo de malaria (Choi et al., 2019). La OMS sugiere el uso de numerosos insecticidas químicos, como los organofosforados, los carbamatos, los piretroides y el diclorodifeniltricloroetano (DDT). Este método de prevención ha sido ampliamente utilizado en programas globales de control de la malaria a partir de los años 40 del siglo XX. De hecho, se le atribuye el éxito de la Campaña Global de Erradicación de la Malaria que tuvo lugar entre los años 1955 y 1969 (Nájera et al., 2011). Tras su introducción, la malaria fue eliminada de distintas regiones, y se ha observado una disminución de las infecciones y de la densidad vectorial en áreas como Sudáfrica y la India (Mabaso et al., 2004). Aunque sigue siendo un método fundamental para el control de la

enfermedad, su uso se ha visto reducido a partir del año 2010, con el aumento en el uso de las mosquiteras tratadas con insecticidas.

Desafortunadamente, la lucha vectorial está perdiendo efectividad debido a la aparición de vectores resistentes a los insecticidas (World Health Organization, 2012). En la actualidad, de los 73 países afectados por la malaria que han compartido datos, 60 han informado sobre la resistencia a por lo menos una clase de insecticida, mientras que 50 han informado sobre la resistencia a dos o más clases. La resistencia a insecticidas se define como la capacidad de un insecto de resistir los efectos tóxicos de un insecticida como consecuencia de la selección natural y la mutación (Davidson, 1957). La exposición repetida a los insecticidas selecciona a los individuos que poseen la maquinaria bioquímica que es capaz de detoxificar los insecticidas o que es menos sensible a estos (Gilbert & Gill, 2010). Estos individuos sobreviven y transmiten el mecanismo de resistencia a las siguientes generaciones, dificultando la lucha antivectorial.

A causa de la aparición de vectores resistentes a insecticidas, se han buscado estrategias alternativas de lucha antivectorial, adquiriendo gran relevancia el control biológico. Consiste en atacar al vector utilizando seres vivos como bacterias larvicidas y hongos entomopatógenos.

Entre los hongos considerados para llevar a cabo el control biológico se encuentran especies pertenecientes a los géneros *Coelomomyces*, *Culicinomyces*, *Beauveira*, *Metarhizium*, *Lagenidium* y *Entomophthora* (E.-J. Scholte et al., 2004). A diferencia de otros agentes infecciosos, los hongos no requieren ser ingeridos por el hospedador; el contacto externo con la cutícula del insecto es suficiente para que se produzca la infección, por lo que se trata de una estrategia de fácil aplicación. Las esporas fúngicas pueden aplicarse en exteriores sobre trampas adhesivas o en superficies interiores, como las cortinas, y pueden persistir durante meses sobre estas superficies (Okumu et al., 2010; E. J. Scholte et al., 2005; Thomas & Read, 2007). Además, pueden actuar solas o en sinergia con varios insecticidas, y son igual de efectivas contra mosquitos resistentes a insecticidas y mosquitos susceptibles (Farenhorst et al., 2010; Howard et al., 2010).

También se está estudiando el uso de bacterias, destacando el género *Bacillus*. Concretamente, *B. thuringiensis* y *B. sphaericus* son las especies larvicidas más efectivas para el control biológico (Charles & Nielsen-LeRoux, 2000). Se trata de cepas cuya producción no es muy costosa, y son de fácil aplicación (Fillinger et al., 2003). Tras su descubrimiento, estas bacterias han colonizado Europa y África, y han participado en operaciones de control de mosquitos a gran escala en estas regiones (Becker, 1998; Guillet et al., 1990).

Otras estrategias de control biológico potencialmente útiles incluyen el uso de peces, parásitos o nematodos. Para determinar la efectividad de estos métodos no se considera únicamente su efectividad en la disminución de la transmisión de la enfermedad, pues también se evalúan sus efectos sobre el medio ambiente. El control biológico comprende una serie de estrategias muy prometedoras para la lucha contra la malaria, y en un futuro podría sustituir el uso de insecticidas, generando un menor impacto sobre el medio ambiente (Kamareddine, 2012).

5.4.2. Fármacos antipalúdicos

Los fármacos antipalúdicos o antimaláricos se utilizan comúnmente para el tratamiento y la prevención de la enfermedad. Desde el descubrimiento de la quinina, el primer tratamiento efectivo contra la malaria, se han desarrollado numerosos antipalúdicos. Sin embargo, a lo largo del tiempo, ciertas cepas del parásito han empezado a mostrar resistencia frente a estos fármacos (Figura 5),

disminuyendo su efectividad y provocando el cese de su uso o la restricción a situaciones particulares. La OMS define la resistencia a los antimaláricos como “la habilidad de una cepa de *Plasmodium* de sobrevivir o multiplicarse tras una exposición adecuada a un determinado fármaco (adecuada administración y absorción de un antimalárico dado en dosis iguales o superiores a las recomendadas y durante el tiempo necesario para su acción normal)”.

Los antimaláricos pueden clasificarse, según la etapa del ciclo vital del parásito sobre la que actúan (Ashley & Phyo, 2018), de la siguiente forma:

- Esquizonticidas tisulares. Actúan sobre los hipnozoitos de *P. vivax* y *P. ovale*, que se encuentran en el hígado y pueden provocar episodios reincidentes de la enfermedad. La pirimetamina, primaquina y la atovuona tienen esta actividad.
- Esquizonticidas eritrocitarios. Son los fármacos más importantes en la quimioterapia malárica y actúan sobre las formas eritrocíticas del parásito. Son la quinina, la cloroquina, la mefloquina, la halofantrina, la artemisinina y sus derivados, la amodiquina, la piperquina, la lumefantrina, la pirimetamina, la sulfadoxina y la pironaridina.
- Gametocidas eritrocitarios. Destruyen las formas sexuales del parásito en la sangre, previniendo así la transmisión de la infección a los mosquitos. La cloroquina, la quinina y la mefloquina tienen actividad gametocida contra *P. vivax* y *P. malariae* y *P. ovale*, pero no contra *P. falciparum*. La primaquina tiene actividad gametocida contra todas las especies de *Plasmodium*.

La quinina fue aislada en 1820 de la corteza de la cinchona, y ha sido utilizada como uno de los tratamientos más efectivos contra la malaria hasta la fecha (Achan et al., 2011). Su uso ha disminuido debido a la aparición de cepas resistentes en los años 80 (Bunnag et al., 1996), aunque sigue estando en la Lista Modelo de Medicamentos esenciales de la OMS (World Health Organization, 2019a). La quinina es activa contra las formas eritrocíticas asexuales de *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. vivax*. Interfiere en la capacidad del parásito de digerir la hemoglobina (Figura 3), impidiendo la formación de hemozoína (pigmento tóxico producido en la digestión de la hemoglobina) (Kapishnikov et al., 2019).

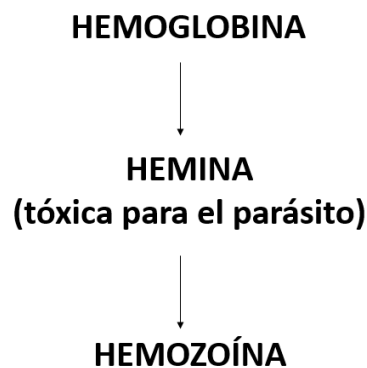


Figura 3. Esquema del catabolismo de la hemoglobina.

La cloroquina comenzó a utilizarse en los años 40 para tratar todas las formas de la malaria (Loeb et al., 1946). En los años 50 se advirtieron los primeros casos de resistencia, que fueron incrementando a lo largo de los años. Este fármaco se sigue empleando para tratar la malaria por *P. vivax* en regiones donde no hay cepas resistentes. La cloroquina inhibe la acción de la hemo polimerasa en los trofozoítos, impidiendo la conversión de la hemina (intermediario producido durante la degradación

de hemoglobina) en hemozoína. Esto resulta en una acumulación de hemina, la cual es tóxica para el parásito (Kapishnikov et al., 2019).

La mefloquina se desarrolló en los años 70 (Trenholme et al., 1975) y sigue utilizándose hoy en día. Fue introducida como tratamiento para las cepas resistentes a la cloroquina, aunque también se ha empleado como profiláctico. En el año 1986 se observaron las primeras resistencias (Brasseur et al., 1986). Actualmente tiene un uso bastante reducido debido a su potencial toxicidad en el sistema nervioso central, que ha afectado a un gran número de usuarios (Nevin & Croft, 2016). La mefloquina produce hinchazón en las vacuolas de *P. falciparum*. Podría actuar formando complejos tóxicos a partir de heminas libres, que dañarían la membrana y la maquinaria celular del parásito (Fitch, 2004).

La halofantrina fue desarrollada entre los años 60 y 70 por el Instituto de Investigación del Ejército Walter Reed (Cosgriff et al., 1982). Empezó a utilizarse como tratamiento contra todas las formas de *Plasmodium*. Sus efectos secundarios han provocado una disminución en su uso, pues es un fármaco con cardiotoxicidad potencial. Por la misma razón, solo se usa para tratar la malaria y no como profiláctico; además, se suministra únicamente a aquellos pacientes que no padecen cardiopatías y solo si la infección es severa y existe resistencia a otros fármacos. Su mecanismo de acción podría ser similar al de la mefloquina, la formación de complejos tóxicos capaces de dañar la membrana celular del parásito (Blauer, 1988).

Actualmente, la Lista Modelo de Medicamentos esenciales de la OMS cuenta con 14 fármacos para el tratamiento curativo de la malaria y 4 fármacos para el tratamiento profiláctico. Los medicamentos más efectivos son las combinaciones basadas en la artemisinina que utilizan un derivado de la artemisinina (actúa a corto plazo) en combinación con uno o varios compuestos complementarios (actúan a largo plazo y poseen mecanismos de acción distintos) (Tse et al., 2019).

La artemisinina se aisló en 1971 a partir de la planta *Artemisia annua*, una hierba que ha sido comúnmente usada en la medicina tradicional china (Qinghaosu Antimalaria Coordinating Research Group, 1979). Debido al enorme impacto positivo que la artemisinina ha tenido en la lucha contra la malaria, su descubridora, Tu Youyou, fue galardonada con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en el año 2015. Este medicamento ha mostrado eficacia frente a todas las formas de *P. falciparum* resistentes a múltiples antipalúdicos. Los derivados más comunes de la artemisinina son el arteméter, el artesunato y el arteéter; son profármacos que se transforman en el metabolito activo, la dihidroartemisinina. Aunque ha tardado en aparecer, el primer caso de resistencia a la artemisinina se registró en el oeste de Camboya en el año 2008 (Noedl et al., 2008). Diez años más tarde, se identificaron más de 30 casos independientes de resistencia a la artemisinina en el Sudeste Asiático (Amato et al., 2018). El mecanismo de acción de las artemisininas ha sido objetivo de debate durante muchos años (O'Neill et al., 2010). La teoría más aceptada propone que la molécula de artemisinina, tras ser activada por la hemina, genera radicales libres que dañan la maquinaria celular del parásito (Tilley et al., 2016; Wang et al., 2015).

La amodiaquina fue sintetizada en 1948 (Berliner & Earle, 1948). Se usa principalmente para el tratamiento de la malaria leve por *P. falciparum*, en combinación con artesunato (Bompart et al., 2011). Su mecanismo de acción es similar al de la cloroquina, forma un complejo con la hemina e inhibe la formación de hemozoína (Combrinck et al., 2013).

La piperaquina se desarrolló en los años 60 como parte de un programa de eliminación de la malaria impulsado en China (L. Chen et al., 1982). Hoy en día se sigue utilizando en combinación con dihidroartemisinina. Se desconoce su mecanismo de acción, aunque ciertos estudios sugieren que actúa acumulándose en la vacuola digestiva del parásito e inhibiendo la detoxificación de la hemina por unión a esta (Eastman & Fidock, 2009; Vennerstrom et al., 1992).

El proyecto chino de investigación denominado “Project 523” llevó a la síntesis de la lumefantrina en 1976. No se conoce su mecanismo de acción, pero podría actuar inhibiendo la formación de β -hematina (sustancia similar a la hemozoína) por complejación con la hemina (Combrinck et al., 2013). Se usa combinado con arteméter.

El proguanil fue identificado como uno de los primeros antifolatos para el tratamiento del paludismo (Curd et al., 1945), mientras que la atovacuona fue descubierta en 1991 (Hudson & Randall, 1991). Cuando se combinan, se obtiene un tratamiento muy efectivo para la malaria gracias al efecto sinérgico producido por sus distintos mecanismos de acción. La atovacuona inhibe el citocromo bc1, bloqueando el transporte electrónico en las mitocondrias del parásito (Fry & Pudney, 1992). El proguanil actúa como inhibidor de la dihidrofolato reductasa a través de su metabolito, el cicloguanil. Sin embargo, cuando se usa en combinación con la atovacuona no tiene esta actividad, sino que reduce la concentración de atovacuona requerida para el tratamiento (Srivastava & Vaidya, 1999).

La pirimetamina fue desarrollada a principios de los años 50 (Russell & Hitchings, 1951). Sus descubridores fueron galardonados con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1988. La sulfadoxina se desarrolló a principios de los años 60 (Laing, 1965). La combinación de pirimetamina con sulfadoxina se aprobó como tratamiento antimalárico en 1981. Ambas actúan a nivel de la ruta de biosíntesis de tetrahidrofolato del parásito (Lumb et al., 2011). El tetrahidrofolato es el precursor de importantes cofactores en numerosas reacciones de transferencia de carbono requeridas en la síntesis de ADN. La pirimetamina inhibe la dihidrofolato reductasa, mientras que la sulfadoxina inhibe la dihidropteroato sintetasa (Figura 4).



Figura 4. Ruta de síntesis del ácido tetrahidrofólico.

La pironaridina se sintetizó en los años 70 en el Instituto Chino de Enfermedades Parasitarias (Chang et al., 1992; Zheng et al., 1979). Ha mostrado ser eficaz contra las cepas resistentes a la cloroquina y se ha estado utilizando durante más de 40 años en combinación con artesunato. Al igual que la lumefantrina, actúa mediante la inhibición de la formación de β -hematina (Croft et al., 2012).

La tafenoquina fue descubierta en 1978 en el Instituto de Investigación del Ejército Walter Reed, y fue recientemente aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA) de EE. UU. para su uso como antipalúdico monodosis para el tratamiento de la malaria causada por *P. vivax*. Se desconoce su mecanismo de acción (Ebste et al., 2016).

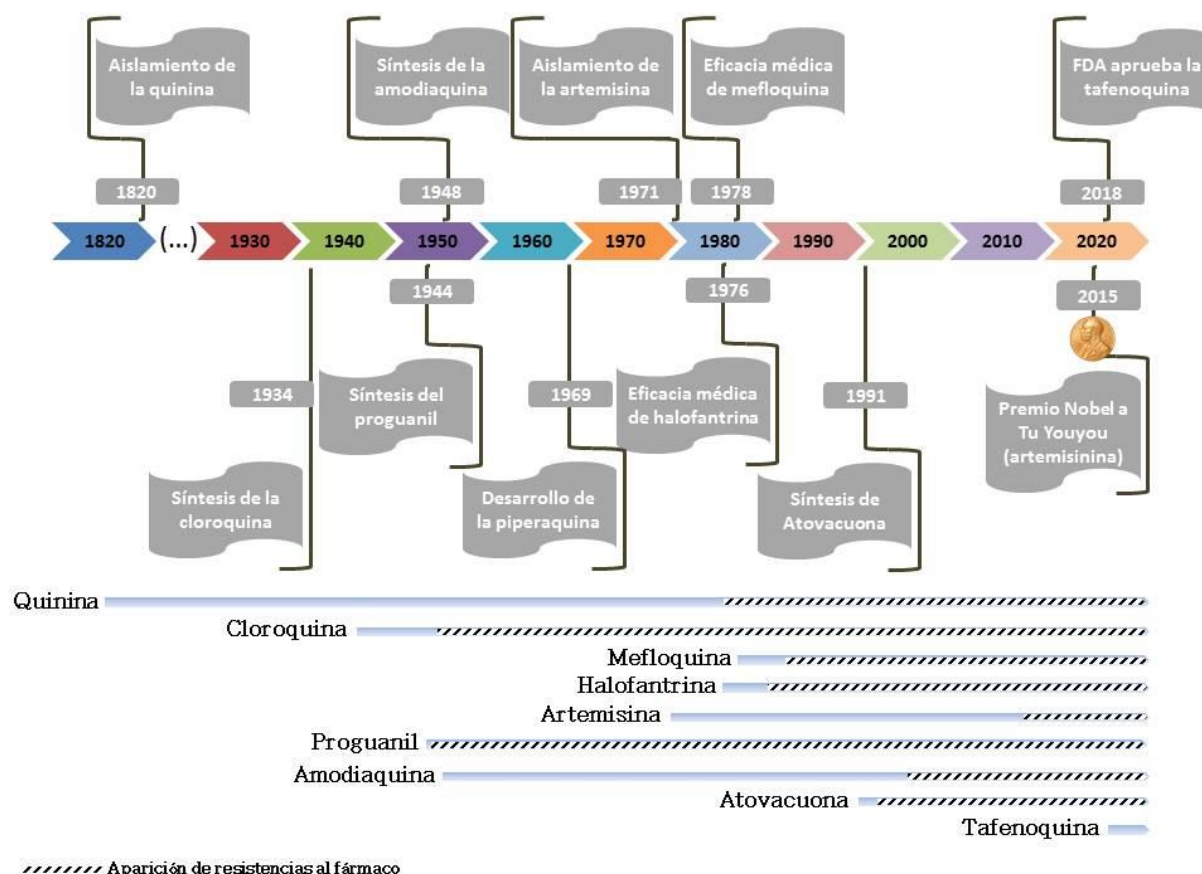


Figura 5. Esquema temporal de los diferentes medicamentos antipalúdicos.

5.4.3. Vacunas antimaláricas

Las vacunas representan una de las estrategias más eficaces y beneficiosas contra las enfermedades infecciosas. Gracias a estas se han conseguido prevenir infecciones que anteriormente daban lugar a grandes epidemias, muertes y/o numerosas secuelas. Es el caso de la viruela, primera enfermedad infecciosa que mediante la vacunación se consiguió erradicar hace ya 40 años. Otro logro importante conseguido gracias a las campañas de vacunación en todo el mundo ha sido la erradicación de los virus salvajes de la polio 2 y 3.

Sin embargo, la malaria es causada por parásitos, y estos tienen una mayor complejidad que los virus y las bacterias. Sus genomas son más grandes y sus ciclos de vida son complejos con diferentes formas morfológicas, cada una con distintas características antigénicas (Hoffman et al., 2015). En la actualidad no se comercializa ninguna vacuna para la prevención de infecciones parasitarias. En el caso de la malaria, la imposibilidad del cultivo *in vitro* de parásitos y la ausencia de modelos animales adecuados de infección suponen dos obstáculos adicionales para el desarrollo de una vacuna eficaz. No obstante, la inmunidad natural adquirida por individuos de zonas endémicas y la inmunidad que adquieren los voluntarios expuestos a esporozoitos irradiados indican la posibilidad de desarrollar una vacuna contra la malaria (Hoffman et al., 2002; Rieckmann et al., 1979; Roestenberg et al., 2011).

En el año 2013, la OMS presentó una hoja de ruta en la cual se establece una serie de pautas para el desarrollo de vacunas antimaláricas (Moorthy et al., 2013). Las vacunas han de ser efectivas contra *P.*

falciparum y *P. vivax* y se tienen que considerar todas las zonas endémicas. Además, la inmunización debe lograrse para individuos de cualquier edad.

En la actualidad, se están desarrollando numerosas vacunas, algunas de ellas están en fase clínica. El principal objetivo es la inducción de las respuestas celular y humoral CD4⁺ y CD8⁺, ya que se conoce el papel de las células T en la malaria, así como la inducción de células de memoria B y T (Wykes et al., 2014). El desarrollo de una vacuna comprende las siguientes etapas:

1. Descubrimiento. Una vez identificado y aislado el agente infeccioso se seleccionan posibles moléculas con poder antigénico.
2. Pruebas preclínicas o Fase 0. Se llevan a cabo las pruebas *in vitro* y las pruebas con animales de experimentación. Con estos estudios se busca conocer las respuestas celulares que se podrían esperar en los humanos, y tener idea sobre la dosis inicial segura para la siguiente fase de la investigación, así como un método seguro para aplicar la vacuna.
3. Pruebas clínicas. Se realizan ensayos en individuos voluntarios. Esta etapa se compone de tres fases, que varían en el número de sujetos que participan en cada una, de forma que la fase I cuenta con un número bajo de individuos, la fase II con cientos de personas y la fase III con miles de voluntarios. Estos ensayos pueden prolongarse a lo largo de varios años y con ellos se pretende obtener evidencias que demuestren que la vacuna es segura y eficaz en seres humanos.
4. Aprobación. Los datos recopilados durante la fase preclínica y la fase clínica son estudiados por organismos reguladores, los cuales tienen que autorizar la comercialización de la vacuna.
5. Suministro, regulación y envío. La vacuna se fabrica en grandes cantidades, de forma que se pueda cubrir la demanda estimada y se envía a los distribuidores.
6. Control. Ya introducida en el mercado, la vacuna sigue siendo sometida a un riguroso control, con objeto de garantizar su seguridad.

Los avances en campos como la genómica, proteómica, inmunología, microbiología o ingeniería genética han permitido nuevos enfoques en el desarrollo de vacunas. En la actualidad se han conseguido importantes avances como identificar epítomos ideales o aumentar la respuesta inmune con la adición de nuevos adyuvantes y la vacunología o ciencia que se dedica al estudio de vacunas ha experimentado una evolución considerable. Hasta finales de la década de los 90 la producción de vacunas se basaba en la utilización de agentes infecciosos inactivos o atenuados. Las vacunas tradicionales incluían:

- Vacunas vivas atenuadas. Se utilizan agentes patógenos atenuados mediante métodos físicos o químicos, de forma que pueden replicarse en su hospedador y desencadenan la respuesta inmune sin causar la enfermedad.
- Vacunas inactivadas. En este caso, los agentes patógenos utilizados están muertos, por lo que la posibilidad de que se produzca la enfermedad es disminuida aún más.
- Vacunas de subunidades. Contienen componentes aislados de los patógenos, que pueden ser de distinta naturaleza (proteínas, lipopolisacáridos) y pueden inducir la respuesta inmune.

Sin embargo, este tipo de vacunas presenta limitaciones, pues en ocasiones los anticuerpos neutralizantes no controlan la infección ya que se requiere de inmunidad celular T o el agente infeccioso presenta una gran variabilidad antigénica como ocurre con ciertos protozoos parásitos, concretamente *Plasmodium*. En las últimas décadas se han desarrollado nuevas estrategias para el desarrollo de vacunas, como es la vacunología estructural, de sistemas o la vacunación heteróloga (González-Romo & Picazo, 2015).

6. VACUNAS FRENTE A LA MALARIA

El desarrollo de vacunas antimaláricas comenzó con estudios en modelos murinos usando esporozoitos irradiados (Nussenzweig et al., 1967). Cinco décadas más tarde, todavía no se dispone de ninguna vacuna comercializada frente a la malaria. Esto se debe a los enormes retos científicos y técnicos que supone el desarrollo de vacunas frente a un parásito tan complejo. Actualmente, la investigación se centra en la mejora de las vacunas candidatas ya existentes, que tratan de combatir la infección en su fase preeritrocítica (las vacunas de subunidades y las vacunas de esporozoitos enteros). También se están buscando nuevas estrategias para lograr la inmunidad en la fase eritrocítica de la enfermedad y para lograr el bloqueo de la transmisión (Draper et al., 2018). En este apartado se llevará a cabo una revisión del progreso en el desarrollo de vacunas antimaláricas frente a las distintas fases del ciclo de vida del parásito (Figura 6). Distinguiremos entre los siguientes tipos de vacunas:

- Vacunas preeritrocíticas. Actúan sobre los esporozoitos inoculados por los vectores, impidiendo la invasión de los hepatocitos. Distinguiremos entre las vacunas de subunidades y las vacunas de esporozoitos enteros.
- Vacunas frente a la fase hepática. Inducen la respuesta inmune frente a hepatocitos parasitados.
- Vacunas frente a la fase hemática. Pueden actuar sobre los merozoitos, impidiendo la invasión de los eritrocitos, o sobre eritrocitos ya infectados.
- Vacunas frente a las fases sexuales o vacunas altruistas. Estas no previenen la infección, pero sí la transmisión.

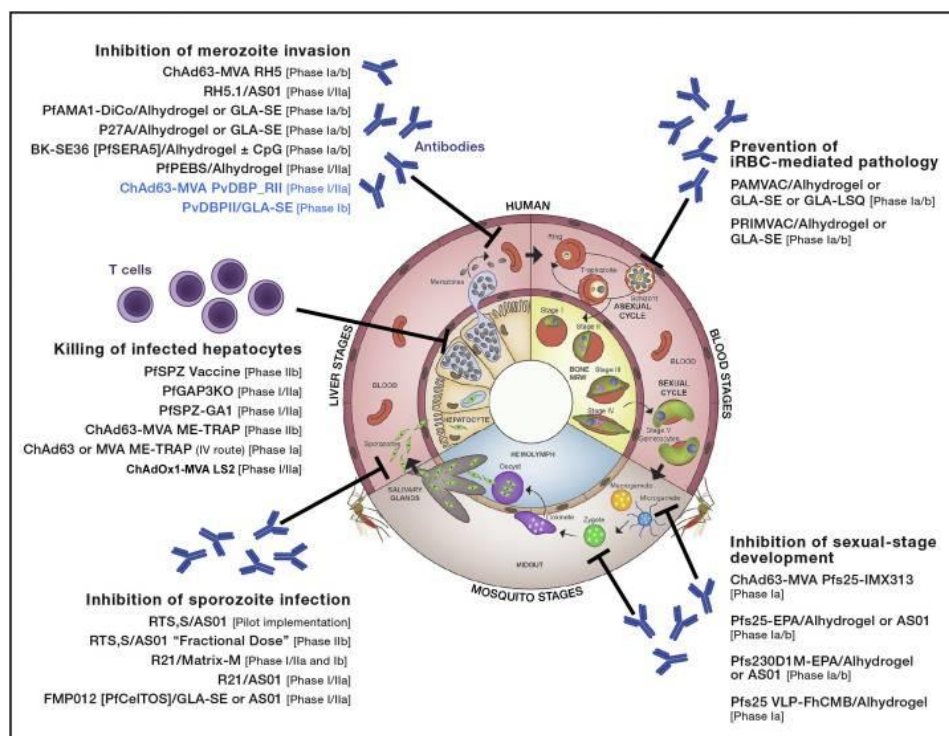


Figura 6. Vacunas candidatas frente a la malaria (Draper et al., 2018)

6.1. Vacunas preeritrocíticas

6.1.1. Vacunas de subunidades

Las vacunas de subunidades son vacunas diseñadas a partir de componentes de patógenos - esporozoitos, en este caso-, los cuales actúan como antígenos específicos capaces de desencadenar la respuesta inmune (inmunógenos) sin que se padezca la enfermedad.

La vacuna frente a *P. falciparum* que más ha avanzado en ensayos clínicos es la denominada RTS,S/AS01, la cual dirige la respuesta inmune frente a la proteína del circumsporozoito (PfCSP). Esta proteína cubre la superficie de los esporozoitos, y tanto su estructura como su función han sido altamente conservadas en varias cepas del parásito. Es esencial para la migración de los esporozoitos hacia las glándulas salivales del mosquito, y también está involucrada en la unión del esporozoito a los hepatocitos del huésped (Sally et al., 2018). RTS,S ha sido diseñada como una partícula semejante a un virus (VLP, *Virus-Like Particle*) con dos componentes: 18 copias de la repetición central y el dominio C-terminal de PfCSP fusionados con el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) en un ratio 1:4 (Figura 7). PfCSP está formada por un péptido señal, un dominio N-terminal, una región central que contiene repeticiones de los tetrapéptidos NANP (Asparagina-Alanina-Asparagina-Prolina) y NVDP (Asparagina-Valina-Ácido Aspártico-Prolina), y una región C-terminal (Doud et al., 2012).

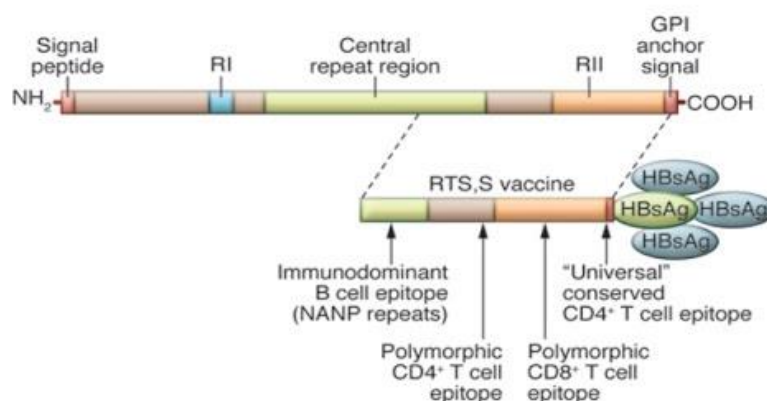


Figura 7. Estructura de PfCSP (arriba) y de RTS,S (abajo). Se puede observar la estructura completa de PfCSP: el péptido señal, el dominio N-terminal, la región central y el dominio N-terminal. RI y RII son regiones involucradas en la unión de PfCSP a la célula hospedadora. RTS,S está compuesta de una parte de la región central, la cual contiene las repeticiones NANP, que conforman un epítipo para las células B. También comprende el dominio C-terminal, en el que se encuentran epítopos de las células T CD4⁺ y CD8⁺. Por último, se le han adicionado 4 copias del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) (Lubanga et al., 2016).

Esta vacuna es la única que ha mostrado efectividad en un ensayo clínico en fase III (The Lancet, 2015), aunque los resultados no han sido tan satisfactorios como se esperaba. Se ha determinado que la protección es parcial, mengua con el tiempo, y podría depender de la edad (la protección fue menor en infantes de entre 6 y 12 semanas que en niños de entre 5 y 17 meses). En estos últimos, tres vacunaciones (una al mes, régimen 0-1-2) redujeron la incidencia de malaria en un 51% a lo largo del año posterior a la última dosis. Tras 48 meses de seguimiento, la eficacia fue de un 26%, y entre los niños que recibieron una cuarta dosis 18 meses después de la tercera, la eficacia fue de un 39%. Según la OMS, durante este ensayo se detectaron dos señales de alarma (meningitis, malaria cerebral) cuyas causas se desconocen, y se ha confirmado la existencia de un riesgo de convulsiones febriles 7 días

después de la vacunación en los niños de entre 5 y 17 meses (WHO, 2016). El avance más reciente en el desarrollo de RTS,S/AS01 se ha logrado modificando la dosis y el régimen de vacunación; administrar la tercera vacuna seis meses después de la segunda reduciendo la dosis a 1/5 de la original resultó en un 86% de individuos protegidos, frente a un 62% entre los sujetos que recibieron la dosis completa en el régimen estándar (0-1-2) (Regules et al., 2016). Sin embargo, este nuevo régimen de vacunación mejora la protección a corto plazo, pues solo 3/7 resultaron protegidos ocho meses más tarde, lo cual sugiere que la durabilidad de la protección ha de ser evaluada y mejorada en futuros ensayos clínicos. Un estudio reciente, en el que se ha llevado a cabo el seguimiento durante 4 años en niños de entre 5 y 17 meses de edad, muestra que la vacuna ha contribuido a la reducción del número de casos de malaria, evitando 4 de cada 10 casos de malaria leve y 3 de cada 10 casos de malaria severa (Guerra Mendoza et al., 2019). También se han visto reducidos los casos de anemia severa, el número de admisiones hospitalarias y de transfusiones de sangre. Así, se ha inferido que el perfil de seguridad de la vacuna es aceptable. La OMS recomienda implementaciones piloto de la vacuna a gran escala para poder determinar el número de dosis más efectivo, el potencial de la vacuna para reducir la mortalidad infantil, y para proveer información adicional sobre su seguridad en el contexto de un uso rutinario. Así, en abril de 2019, la OMS dio a conocer su iniciativa para vacunar a millones de niños en Malawi, Ghana y Kenia, con la que se espera salvar la vida de entre el 20 y el 30% de los niños vacunados.

No se conoce el mecanismo exacto de RTS,S, y su mayor limitación parece ser el mantenimiento de altos niveles de anticuerpos durante periodos largos de tiempo. Por tanto, el principal objetivo para la mejora de esta vacuna, así como para el desarrollo de nuevas vacunas, es la extensión del periodo de protección. Aunque todavía no se conoce el mecanismo de protección exacto de esta vacuna, la información de la que se dispone sugiere que la protección está relacionada con la inducción de altas concentraciones de anticuerpos anti-NANP; por tanto, la disminución de la protección podría deberse al descenso de estas concentraciones (M. T. White et al., 2015). En adición a la generación de anticuerpos, las respuestas mediadas por las células T CD4⁺ y CD8⁺ también podrían influir en la protección (Kazmin et al., 2017), ya que la región C-terminal de PfCSP contiene epítomos reconocidos por estas células (Neafsey et al., 2015).

RTS,S se administra junto al adyuvante AS01. Los adyuvantes son compuestos que se adicionan a las vacunas para estimular o dirigir la respuesta inmune frente a un antígeno, e influyen en la durabilidad de los anticuerpos. Nuevos adyuvantes y sistemas de entrega de vacunas podrían mejorar la protección, especialmente si pueden mostrar la capacidad de desviar la respuesta inmune hacia la inducción de células plasmáticas de vida larga. Estudios realizados sobre la producción de anticuerpos frente a una proteína de la cubierta del VIH, demostraron que la durabilidad de estos variaba según el tipo de adyuvante (Francica et al., 2017). Una estrategia alternativa para prolongar la protección es mejorar la respuesta inmune alterando los regímenes de vacunación o identificando nuevos epítomos neutralizantes de PfCSP, ya que como hemos visto anteriormente la vacuna RTS,S no contiene la región N-terminal ni ciertas porciones de la región central de la proteína.

En un intento por mejorar la eficacia de RTS,S se ha desarrollado R21, otra vacuna basada en PfCSP. Es también una vacuna de subunidades, equivalente a RTS,S pero con una única copia de HBsAg (Collins et al., 2017). Un ensayo clínico en fase I muestra que esta vacuna, en formulación con el adyuvante Matrix-M, es segura y se tolera bien en individuos británicos y africanos, además de tener una eficacia similar a RTS,S (Venkatraman et al., 2019). Para mejorarla, sus desarrolladores proponen combinar esta vacuna con el régimen heterólogo de vacunación “prime-boost” basado en vectores virales. Consiste en la administración de una primera dosis vacunal como sensibilizante (“prime”), y una segunda dosis vacunal como refuerzo (“boost”). Este régimen ha demostrado ser más inmunogénico en primates no humanos, además de conferir una mayor protección (Capone et al., 2010). Por otra

parte, se ha fabricado una partícula semejante a un virus que contiene la secuencia completa de PfCSP para futuros ensayos clínicos (Genito et al., 2017), dado el potencial de inducir anticuerpos frente a epítomos adicionales (no presentes en RTS,S) que mostraron función antiparasitaria en modelos murinos (Espinosa et al., 2015).

Las vacunas basadas en estructuras conforman una nueva estrategia en el campo del desarrollo de vacunas frente a proteínas virales (Kwong, 2017). El desarrollo de este tipo de vacunas comienza con el aislamiento de anticuerpos monoclonales (mAbs) de humanos expuestos a la infección. La estructura del epítomo unido al mAb se determina por resolución atómica y la información resultante se utiliza para diseñar inmunógenos capaces de inducir la formación de anticuerpos funcionales. Esta nueva estrategia se está considerando para el desarrollo de vacunas antimaláricas, pues están adquiriendo importancia los estudios estructurales de diferentes proteínas de superficie de *Plasmodium*, incluida PfCSP (Oyen et al., 2017).

También cabe destacar la importancia de la identificación de nuevos antígenos diferentes a PfCSP en los esporozoitos. La única diana distinta que se está probando en ensayos clínicos es PfCelTOS, una proteína micronemal secretada que resulta crucial para el movimiento del parásito tanto en el vector como en el huésped (Draper et al., 2015; Pirahmadi et al., 2018). PfCelTOS no ha mostrado ser eficaz al formularse con el adyuvante GLA-SE. No obstante, se dispone de extensas listas de antígenos potenciales creadas empleando aproximaciones genómicas, proteómicas y transcriptómicas (Swearingen et al., 2016), acompañadas de ensayos inmunológicos (Davies et al., 2015). La priorización de estas dianas requiere de un ensayo capaz de determinar si existe una relación entre cada una de ellas y la protección clínica, lo cual sigue siendo un gran reto para el desarrollo de vacunas antimaláricas.

6.1.2. Vacunas de esporozoitos enteros

Las vacunas de esporozoitos enteros (*WSVs, Whole Sporozoites Vaccines*) se basan en la inoculación de esporozoitos vivos con objeto de lograr la inmunización. Existen tres enfoques para este tipo de vacunas:

- Vacunas de esporozoitos atenuados por radiación o vacunas RAS (*Radiation-Attenuated Sporozoites*).
- Vacunas de parásitos atenuados genéticamente o vacunas GAP (*Genetically Attenuated Parasite*).
- Vacunas de esporozoitos sin atenuar, pero que son administrados junto con fármacos que llevan a cabo una función de quimioprolifaxis.

Las vacunas RAS, que fueron las primeras vacunas de esporozoitos enteros en estudiarse en roedores y humanos, detienen la infección en la fase hepática. Fueron, además, las primeras vacunas en conferir protección frente a la infección por la picadura de mosquitos. Un gran avance en el desarrollo de vacunas antimaláricas fue el aislamiento de un esporozoito irradiado purificado, aséptico y criopreservado: la vacuna PfSPZ. La administración intravenosa de esta induce la respuesta inmune en seres humanos (Seder et al., 2013), la cual está relacionada con la acción de las células T CD8⁺ residentes en el tejido hepático (Epstein et al., 2011). Por otro lado, la administración subcutánea confirió una protección más limitada contra la infección humana de malaria controlada (*CHMI, Controlled Human Malaria Infection*) que la intravenosa. La CHMI consiste en la infección deliberada con parásitos causantes de la malaria, ya sea por picadura de mosquitos o por inyección directa de

esporozoitos o eritrocitos parasitados. Un estudio más reciente en adultos de Malia demostró que la vacuna es segura y fácilmente administrable por inoculación venosa directa, y que resultaba en una menor proporción de infectados al final de la temporada de alta transmisión (Sissoko et al., 2017).

Un método de atenuación más homogéneo es la delección dirigida de genes de esporozoitos. El primer ensayo clínico en el que se utilizó un parásito atenuado genéticamente consistió en la delección de los genes p52⁻ y p36⁻ de *P. falciparum*, que codifican para proteínas esenciales en la invasión de los hepatocitos por parte de los esporozoitos (Spring et al., 2013). Este primer ensayo resultó en una infección severa. No obstante, un estudio reciente mostró que una vacuna GAP con tres genes eliminados (p52⁻, p36⁻ y sap1⁻) denominada PfGAP3KO detiene la infección en un punto temprano de la fase hepática y es segura, está completamente atenuada y confiere inmunidad a individuos infectados por las picaduras de mosquitos (Kublin et al., 2017). La vacuna fue administrada a 10 individuos sanos y todos mostraron inmunidad durante los 28 días que duró el estudio. La eficacia de esta vacuna frente a la infección controlada está todavía por determinar.

Otras vacunas de esporozoitos enteros contienen al parásito cubierto de cloroquina, de forma que se permite su desarrollo completo en la fase hepática, pero se elimina al entrar al torrente sanguíneo, evitándose la enfermedad. Esta estrategia mostró un 100% de protección en voluntarios 8 semanas después de la última inmunización, con 4 de 6 voluntarios protegidos frente a la infección controlada dos años más tarde (Roestenberg et al., 2011). Sin embargo, la vacunación no resultó efectiva contra cepas genéticamente distintas (Walk et al., 2017). Los datos sugieren que la alta variación genética entre cepas reduce la eficiencia de los anticuerpos. Así, en estos ensayos se recalca la necesidad de diseñar regímenes que aumenten la amplitud de la respuesta inmune.

6.2. Vacunas frente a la fase hepática

La generación de respuestas fuertes mediadas por las células T CD8⁺ frente a hepatocitos parasitados requiere distintas plataformas de inmunización. En la actualidad, las estrategias más avanzadas se basan en el uso de vectores virales recombinantes; concretamente, el adenovirus de chimpancé serotipo 63 (ChAd63) y el virus vaccinia Ankara modificado (MVA) como refuerzo (Ewer et al., 2015). El inserto más probado en estos vectores contiene la proteína de adhesión relacionada a trombospondina, unida a una cadena multiepitópica (ME-TRAP). La vacunación confirió entre un 20 y un 25% de protección estéril frente a la infección controlada, lo que se ha asociado a una respuesta mediada por las células T CD8⁺ periféricas (Ewer et al., 2013). Esta misma vacuna redujo el riesgo de infección en un 67% en adultos kenianos (Ogwang et al., 2015), pero no mostró eficacia alguna en Senegal (Mensah et al., 2016). También está por determinar la eficacia de la vacuna en el grupo de niños de entre 5 y 17 meses, aunque ciertos ensayos muestran resultados prometedores (Bliss et al., 2017).

También se han llevado a cabo estudios con los vectores ChAd63-MVA utilizando insertos diferentes, entre los cuales PfCSP, pero no han aportado mejores resultados que ME-TRAP (Hodgson et al., 2015). En cambio, el uso del adenovirus humano serotipo 5 (AdHu5) como vector de refuerzo con PfCSP y PfAMA1 como insertos aportó resultados prometedores: protección esterilizante en 4 de 15 voluntarios (Chuang et al., 2013). El reconocimiento y la eliminación del hepatocito infectado por parte de las células T CD8⁺ requiere la presentación del MHC (*Major Histocompatibility Complex*, complejo mayor de histocompatibilidad) de clase I en la superficie de la célula afectada, por lo que actualmente se persigue la identificación de nuevos antígenos que aceleren este proceso (Huang et al., 2015). Algunos estudios sugieren que las proteínas de superficie del esporozoito y las proteínas excretadas

por el parásito en la fase hepática pueden ser presentadas con mayor eficacia que las proteínas citoplasmáticas (Doll et al., 2016; Montagna et al., 2014). Sin embargo, la lista de antígenos potenciales se ve limitada por la falta de conocimiento acerca de las proteínas expresadas durante la fase hepática de *P. falciparum*. Esta falta de conocimiento se debe a la ausencia de una fuente que aporte un número suficiente de hepatocitos infectados, y podría verse resuelta por avances como los modelos murinos con hepatocitos quiméricos humanizados, el cultivo *in vitro* de hepatocitos parasitados y la citometría de flujo (Longley et al., 2015).

Además de la selección de los antígenos, una segunda exposición podría resultar crucial para la formación de una población de células T de memoria residentes en el tejido hepático. Por ello, se han desarrollado estrategias denominadas “prime-boost”, las cuales preparan la respuesta mediada por células T a través de una vacunación periférica, y después la dirigen a los hepatocitos utilizando un vector de refuerzo. Este tipo de estrategias están proporcionando resultados muy prometedores en modelos murinos (Fernandez-Ruiz et al., 2016).

6.3. Vacunas frente a la fase hemática

La inmunidad a la malaria adquirida de forma natural surge tras una exposición repetida a una diversidad de parásitos hemáticos, la generación de un amplio repertorio de anticuerpos frente a merozoitos y eritrocitos infectados, y una compleja interacción entre las respuestas inflamatorias y las respuestas celulares inmunorreguladoras. Recientemente, se han desarrollado merozoitos químicamente atenuados (Raja et al., 2017) y vacunas de subunidades frente a la malaria asociada al embarazo (Pehrson et al., 2017), que parecen replicar ciertos aspectos de la inmunidad adquirida de forma natural. Los esfuerzos asociados a este tipo de vacunas se han centrado en una reducida lista de antígenos de merozoitos, buscando la inducción de anticuerpos capaces de bloquear la invasión de los eritrocitos. Estas estrategias podrían acortar la vida de los parásitos en el torrente sanguíneo, prevenir la enfermedad y el desarrollo de gametocitos, evitando así la transmisión de la enfermedad.

Otro inconveniente observado en este tipo de vacunas es la inducción de respuestas específicas para cepas concretas, las cuales no pueden cubrir los altos niveles de polimorfismos en los antígenos de los merozoitos. Por otra parte, la cinética de la invasión a los eritrocitos por parte de los merozoitos también tiene un papel importante en la determinación de las vacunas candidatas. Ciertos estudios *in vitro* muestran que los merozoitos invaden los eritrocitos en menos de un minuto (Weiss et al., 2016), mientras que se liberan algunos antígenos de los orgánulos que quedan expuestos durante una pequeña fracción de tiempo. Los eventos ocurren tan rápido que se necesitan concentraciones muy altas de anticuerpos para sobrepasar los requerimientos termodinámicos que conlleva la unión antígeno-anticuerpo. Tanto la concentración como la calidad de los anticuerpos determinan la eficacia de la protección, y son dos parámetros que requieren mejoras sustanciales en las vacunas futuras. Los esfuerzos actuales para superar estos inconvenientes se basan en el uso de cócteles de alelos del antígeno PfAMA1, buscando la generación de anticuerpos frente a epítopos conservados para una mejora de la cobertura de una amplia gama de merozoitos polimórficos (Sirima et al., 2017). AMA1 (*Apical Membrane Antigen 1*) es una proteína ubicada en la superficie de los merozoitos y juega un papel fundamental en la invasión de los eritrocitos (Figura 8). Este antígeno se ha usado además en conjunto con su ligando peptídico PfRON2, resultando en una mejor protección *in vivo* en primates del género *Aotus* (Srinivasan et al., 2017).

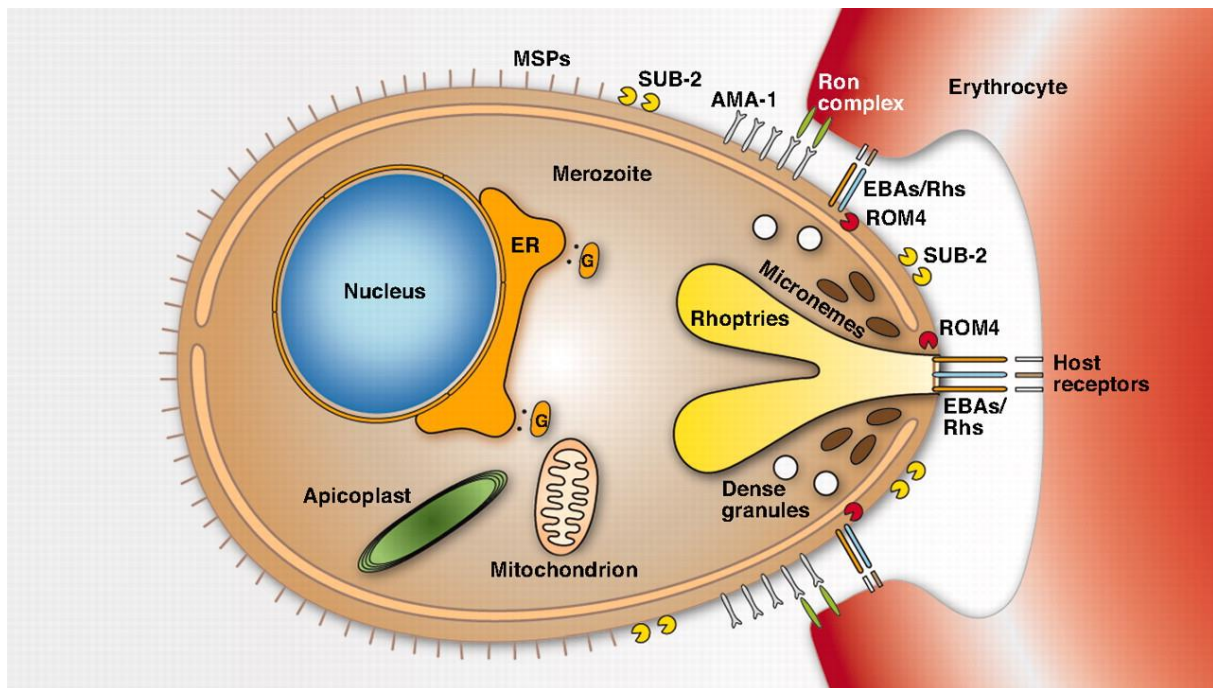


Figura 8. Unión del merozoito al eritrocito. Se observan las proteínas implicadas en este proceso, entre las cuales se encuentran AMA1 y la familia Rh (Kappe et al., 2010).

Sin embargo, existen antígenos que parecen superar las dificultades provocadas por los polimorfismos, lo cual se debe a la conservación de sus secuencias. El más avanzado es el homólogo 5 de la proteína de unión al reticulocito (PfRH5), que interacciona con la basigina, un receptor de la superficie de los eritrocitos que parece ser esencial para que ocurra la invasión (Crosnier et al., 2011). El alto nivel de conservación de su secuencia se asocia con ciertos requerimientos funcionales para la unión a la basigina (Draper et al., 2015). La vacunación de animales con PfRH5 induce la generación de anticuerpos capaces de inhibir *in vitro* todas las líneas de *P. falciparum* que se han probado.

En adición, se ha fabricado un complejo multiproteico que además de PfRH5, contiene PfRipr y PfCyRPA, dos moléculas altamente conservadas capaces de inducir la producción de anticuerpos funcionales (Lin Chen et al., 2011; Reddy et al., 2015). PfRH5 se acopla a otra proteína de la superficie del merozoito (PfP113) para reforzar la unión con el eritrocito durante la invasión (Galaway et al., 2017) (Figura 9). El uso de todos estos componentes podría mejorar la eficacia de la vacuna, pues los anticuerpos frente a PfRH5 actúan de forma sinérgica con los anticuerpos frente a PfCyRPA (Reddy et al., 2015). En paralelo, se está tratando de identificar nuevas combinaciones de antígenos mediante estudios genómicos (Zhang et al., 2018). Después de varias décadas, las vacunas de merozoitos están recuperando protagonismo, con la aparición de nuevas aproximaciones y vacunas candidatas.

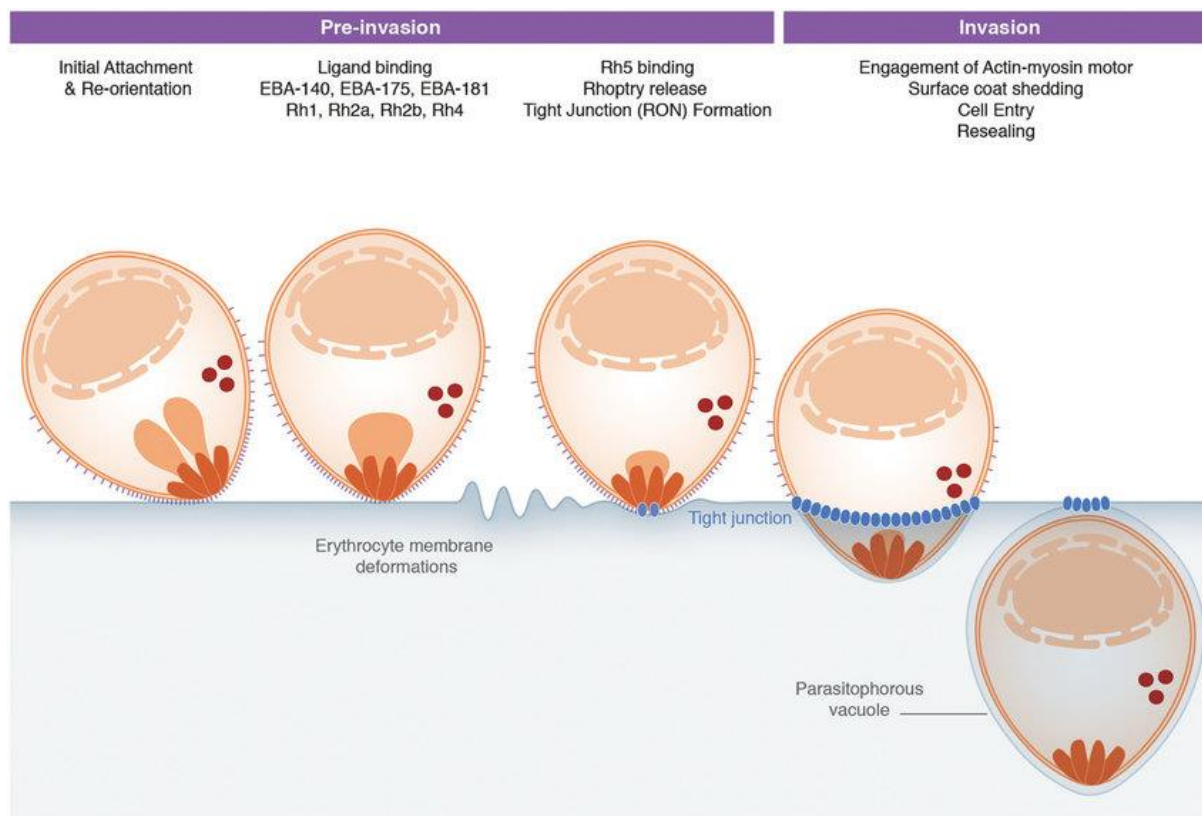


Figura 9. Esquema de la invasión de los eritrocitos por parte de los merozoitos. El acoplamiento inicial del merozoito puede ocurrir en cualquier orientación, aunque después el merozoito se reorienta de forma que su polo apical esté en contacto con la membrana del eritrocito. Ocurren numerosas interacciones entre proteínas del parásito y proteínas del eritrocito (Koch & Baum, 2016).

6.4. Vacunas frente a las fases sexuales

Las vacunas frente a las fases sexuales del parásito o vacunas altruistas no previenen la infección ni los síntomas asociados a esta, pero tienen impacto sobre el ciclo de vida del parásito dentro del vector, siendo su objetivo prevenir el desarrollo de esporozoitos y la transmisión. A pesar de que este tipo de vacunas no protegerían de forma directa al individuo, podrían tener un impacto sustancial sobre la transmisión. En una población endémica con portadores asintomáticos del parásito, podría proveer protección a la comunidad mediante la inmunidad de grupo.

Los antígenos mejor estudiados son Pfs25 (una proteína de la superficie del oocineto), Pfs48/45 y Pfs230 (antígenos de los gametocitos). Anticuerpos contra estos tres últimos antígenos han mostrado buenos resultados en estudios preclínicos comparativos (Kapulu et al., 2015) utilizando mosquitos alimentados con gametocitos cultivados en presencia de los anticuerpos. Aun así, existen investigaciones dirigidas hacia la identificación de nuevas dianas antigénicas (Stone et al., 2018). Otras dianas de interés son Pfs47 (proteína de la superficie de los oocinetos involucrada en la evasión del sistema inmune del vector por interacción con ciertos componentes de este) (Molina-Cruz et al., 2013) y PfHAP2 (se expresa en los gametocitos masculinos y es esencial para la fusión de membranas durante la fertilización) (Angrisano et al., 2017).

El primer antígeno en progresar hacia la fase clínica fue Pfs25; sin embargo, al formularse con el adyuvante Montanide ISA51, mostró niveles inaceptables de reactividad (Wu et al., 2008). Por

tanto, los esfuerzos subsecuentes se han centrado en la mejora de la plataforma de entrega de la vacuna. Así, se están llevando a cabo ensayos utilizando los adyuvantes Alhydrogel y AS01 junto a Pfs25 conjugada con la exoproteína A de *Pseudomonas aeruginosa* (Pfs25-EPA) (MacDonald et al., 2016).

Por otra parte, se está intentando diseñar un inmunógeno a partir de Pfs48/45, destacando un antígeno quimérico compuesto por la fusión entre una parte de Pfs48/45 (conteniendo el dominio 6-cisteína de la región C-terminal) y la porción denominada R0 de PfGLURP (proteína de la fase asexual). Esta quimera denominada R0.6C es producida utilizando *Lactococcus lactis* y se llevarán a cabo ensayos clínicos con ella (Theisen et al., 2017). Otras investigaciones centradas en la búsqueda de epítomos han llevado a la identificación de dos sitios inmunogénicos en la estructura cristalina del antígeno Pfs25 unido a anticuerpos (Sally et al., 2017). Estos dos sitios no solapan, por lo que pueden ser atacados simultáneamente. Este descubrimiento proporciona información estructural de mucha utilidad para el desarrollo de nuevas vacunas antimaláricas.

6.5. Vacunas frente a *P. vivax*

La mayoría de los esfuerzos para el desarrollo de una vacuna efectiva frente a la malaria se han centrado en la especie más mortal, *P. falciparum*, aunque *P. vivax* está adquiriendo cada vez más relevancia, puesto que es la especie predominante en Centroamérica pudiendo provocar infecciones severas con el inconveniente adicional de las recidivas (Mueller et al., 2015).

Una vacuna frente a la fase preeritrocítica podría prevenir la infección y la formación de hipnozoitos, reduciendo el riesgo de transmisión y las recidivas (M. White et al., 2017). Hasta la fecha, únicamente dos vacunas de este tipo han alcanzado la fase clínica, y ambas se basan en la proteína del circumsporozoito (PvCSP). No se han desarrollado vacunas de esporozoitos enteros, pues ciertos estudios sugieren que en este caso se requieren dosis muy altas para alcanzar la protección (Arévalo-Herrera et al., 2016). La vacuna VMP001/AS01 (basada en PvCSP) mostró inmunogenicidad en voluntarios estadounidenses, pero no logró inducir una protección esterilizante frente a la infección controlada transmitida por mosquitos. Sin embargo, se observó una disminución significativa de la parasitemia en 16 de 27 sujetos vacunados (Bennett et al., 2016). Además, una partícula similar a un virus denominada Rv21 con una mayor densidad de PvCSP en su superficie está progresando hacia el desarrollo clínico (Salman et al., 2017). El uso de ratones modificados genéticamente está facilitando el acceso a los hipnozoitos, haciendo posible el desarrollo de nuevas vacunas frente a estas formas latentes del parásito (Gural et al., 2018).

En la fase hemática, la invasión de los eritrocitos por parte de *P. vivax* está restringida a los reticulocitos que expresan la proteína TfR1/CD71 (receptor de la superficie del parásito relacionado con el transporte de hierro) (Malleret et al., 2015). Además, requiere la interacción entre la proteína PvDBP (*Duffy-binding Protein*, proteína de unión a Duffy) y el antígeno humano Duffy (también denominado DARC/Fy) (Figura 10). Este antígeno está presente en la superficie de los eritrocitos de algunos individuos, que se conocen como Duffy-positivos, y son más susceptibles a la infección. Las únicas vacunas en desarrollo clínico tienen como diana la región II rica en cisteína de PvDBP, y están aportando resultados prometedores (R. O. Payne et al., 2017). No obstante, la falta de sistemas de cultivo *in vitro* del parásito a largo plazo dificulta el estudio de las respuestas inducidas por estas vacunas. De forma preclínica, se están llevando a cabo estudios estructurales de PvDBP (E. Chen et al., 2016), que podrían servir como guía para el desarrollo de futuros inmunógenos. Por otra parte, se han observado infecciones en individuos Duffy-negativos (Zimmerman et al., 2013), que podrían deberse a una duplicación del gen PvDBP (Menard et al., 2013) resultando en una nueva proteína de unión a

eritrocitos (Hester et al., 2013). Sin embargo, ciertos estudios sugieren que esta duplicación no está relacionada con la infección de individuos Duffy-negativos (Hostetler et al., 2016). En definitiva, no se conocen las bases moleculares de la invasión de los eritrocitos DARC-negativos, pero podría estar relacionada con PvDBP. En paralelo, se están describiendo otras familias de antígenos relacionados con la invasión de los eritrocitos, entre las que se encuentran las proteínas de unión a reticulocitos (PvRBPs). Esto proporciona una creciente lista de dianas terapéuticas, que podrían llevar al desarrollo de nuevas estrategias sobre las que construir nuevas vacunas frente a la fase eritrocítica de *P. vivax*.

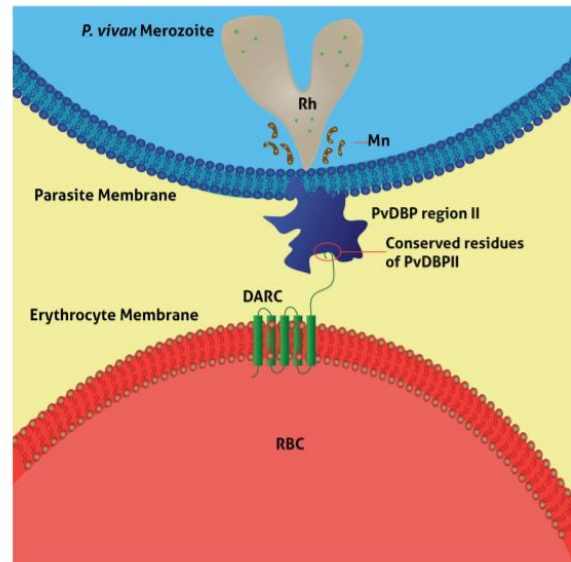


Figura 10. Interacción entre PvDBP y el antígeno Duffy (DARC), requerida para la invasión (Bhardwaj et al., 2017).

6.6. Futuro del desarrollo de vacunas antimaláricas

En los próximos años, se espera que RTS,S/AS01 supere la fase de pruebas clínicas y se evalúe la posibilidad de aprobarla para su comercialización, si los ensayos que se están llevando actualmente culminan con buenos resultados. Otras vacunas que persiguen la aprobación son PfSPZ y R21, aunque están más lejos que RTS,S de superar las pruebas clínicas. En paralelo, se estudiarán nuevas estrategias que podrían dar lugar a vacunas de nueva generación, que consigan inducir una protección más intensa y duradera, pues es el objetivo principal para la mejora de las candidatas actuales.

Una estrategia que está ganando protagonismo es la combinación de algunas de las vacunas candidatas (que actúen sobre fases diferentes del ciclo de vida del parásito), de forma que se obtenga una vacuna multiestado. Esta podría inducir una protección aditiva o incluso sinérgica. Un estudio en el que se combinó RTS,S/AS01 con ChAd63-MVA ME-TRAP no mejoró la protección frente a la malaria controlada (Rampling et al., 2016). Sin embargo, otro estudio reciente mostró un efecto sinérgico al combinar vacunas preeritrocíticas con vacunas que bloquean la transmisión (Sherrard-Smith et al., 2018). De hecho, la mayoría de los investigadores apuestan por una vacuna multiestado. El número creciente de vacunas candidatas frente a distintas etapas del ciclo de vida del parásito facilitará el estudio de este tipo de estrategias.

7. CONCLUSIONES

Tras la realización de esta revisión bibliográfica se han podido extraer las siguientes conclusiones:

1. La malaria sigue siendo un problema de primer nivel en numerosos países en vías de desarrollo a pesar de que los esfuerzos por combatir la enfermedad, iniciados hace más de un siglo, han contribuido a la disminución de la mortalidad.
2. La lista de especies de *Plasmodium* capaces de infectar al ser humano está creciendo, debido a la aparición de casos de zoonosis en distintas partes del mundo, lo cual complica aún más el control de la enfermedad.
3. La medida más eficaz contra la malaria ha resultado ser la lucha antivectorial. Sin embargo, la aparición de resistencias a los insecticidas, del mismo modo que a los medicamentos antimaláricos, han puesto de manifiesto la necesidad de abordar nuevas estrategias para controlar la enfermedad.
4. Se están desarrollando numerosas vacunas, y algunas de ellas están en etapas avanzadas de las pruebas clínicas, proporcionando resultados muy prometedores y aportando nuevos conocimientos sobre los mecanismos de protección frente a esta enfermedad.
5. Actualmente la vacuna experimental más avanzada es la RTS,S, que ha demostrado ser efectiva en la población infantil reduciendo el número de casos de malaria durante al menos 3 o 4 años, aunque la cobertura de dicha vacuna sigue siendo insuficiente, no llegando al 30%.
6. Es necesario seguir profundizando en la biología del parásito, el desarrollo de la enfermedad y la respuesta inmune del hospedador para el desarrollo de una vacuna eficaz.
7. Por otro lado, el desarrollo de vacunas con esporozoitos enteros atenuados es otra alternativa que está mostrando resultados esperanzadores.
8. También se están desarrollando vacunas altruistas que no previenen la infección ni el desarrollo de la enfermedad, pero evitan su transmisión.
9. Hasta el momento, los esfuerzos para conseguir una vacuna frente a *Plasmodium* estaban centrados en la especie *P. falciparum*, pero el interés creciente por *P. vivax*, debido al aumento en el número de casos de malaria severa, ha hecho que la búsqueda se amplíe también a esta especie.
10. Dada la compleja biología del parásito y en vista de los resultados obtenidos con las vacunas candidatas hasta ahora, la mayoría de los investigadores apuestan por una vacuna multiestado.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Achan, J., Talisuna, A. O., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J. K., Baliraine, F. N., Rosenthal, P. J., & D'Alessandro, U. (2011). Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: Role in the treatment of malaria. In *Malaria Journal*. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-144>
- Acharya, P., Garg, M., Kumar, P., Munjal, A., & Raja, K. D. (2017). Host-parasite interactions in human malaria: Clinical implications of basic research. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00889>
- Amato, R., Pearson, R. D., Almagro-Garcia, J., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., Sreng, S., Drury, E., Stalker, J., Miotto, O., Fairhurst, R. M., & Kwiatkowski, D. P. (2018). Origins of the current outbreak of multidrug-resistant malaria in southeast Asia: a retrospective genetic study. *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30068-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30068-9)
- Angrisano, F., Sala, K. A., Da, D. F., Liu, Y., Pei, J., Grishin, N. V., Snell, W. J., & Blagborough, A. M. (2017). Targeting the Conserved Fusion Loop of HAP2 Inhibits the Transmission of *Plasmodium berghei* and *falciparum*. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.024>
- Ansari, H. R., Templeton, T. J., Subudhi, A. K., Ramaprasad, A., Tang, J., Lu, F., Naeem, R., Hashish, Y., Oguike, M. C., Benavente, E. D., Clark, T. G., Sutherland, C. J., Barnwell, J. W., Culleton, R., Cao, J., & Pain, A. (2016). Genome-scale comparison of expanded gene families in *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* with *Plasmodium malariae* and with other *Plasmodium* species. *International Journal for Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.05.009>
- Arévalo-Herrera, M., Vásquez-Jiménez, J. M., Lopez-Perez, M., Vallejo, A. F., Amado-Garavito, A. B., Céspedes, N., Castellanos, A., Molina, K., Trejos, J., Oñate, J., Epstein, J. E., Richie, T. L., & Herrera, S. (2016). Protective Efficacy of *Plasmodium vivax* Radiation-Attenuated Sporozoites in Colombian Volunteers: A Randomized Controlled Trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005070>
- Arnott, A., Barry, A. E., & Reeder, J. C. (2012). Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination. In *Malaria Journal*. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-14>
- Ashley, E. A., & Phyo, A. P. (2018). Drugs in Development for Malaria. *Drugs*. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0911-9>
- Barber, B. E., Rajahram, G. S., Grigg, M. J., William, T., & Anstey, N. M. (2017). World Malaria Report: time to acknowledge *Plasmodium knowlesi* malaria. *Malaria Journal*. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1787-y>
- Barillas-Mury, C., & Kumar, S. (2005). *Plasmodium*-mosquito interactions: A tale of dangerous liaisons. In *Cellular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00615.x>
- Bartoloni, A., & Zammarchi, L. (2012). Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. In *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2012.026>
- Becker, N. (1998). The use of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) against mosquitoes, with special emphasis on the ecological impact. *Israel Journal of Entomology*.
- Bell, D., Wongsrichanalai, C., & Barnwell, J. W. (2006). Ensuring quality and access for malaria diagnosis: How can it be achieved? In *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1474>
- Bennett, J. W., Yadava, A., Tosh, D., Sattabongkot, J., Komisar, J., Ware, L. A., McCarthy, W. F., Cowden,

- J. J., Regules, J., Spring, M. D., Paolino, K., Hartzell, J. D., Cummings, J. F., Richie, T. L., Lumsden, J., Kamau, E., Murphy, J., Lee, C., Parekh, F., ... Ockenhouse, C. F. (2016). Phase 1/2a Trial of Plasmodium vivax Malaria Vaccine Candidate VMP001/AS01B in Malaria-Naive Adults: Safety, Immunogenicity, and Efficacy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004423>
- Berliner, R. W., & Earle, D. P. (1948). Studies on the chemotherapy of the human malarias; of the human malarias the physiological disposition, antimalarial activity, and toxicity of several derivatives of 4-aminoquinoline. *The Journal of Clinical Investigation*.
- Bhandari, P., Raghuveer, C., Rajeev, A., & Bhandari, P. (2008). Comparative study of peripheral blood smear, quantitative buffy coat and modified centrifuged blood smear in malaria diagnosis. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.40419>
- Bhardwaj, R., Shakri, A. R., Hans, D., Gupta, P., Fernandez-Becerra, C., del Portillo, H. A., Pandey, G., & Chitnis, C. E. (2017). Production of recombinant PvDBPIL, receptor binding domain of Plasmodium vivax Duffy binding protein, and evaluation of immunogenicity to identify an adjuvant formulation for vaccine development. *Protein Expression and Purification*. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.06.011>
- Bharti, A. R., Patra, K. P., Chuquiyauri, R., Kosek, M., Gilman, R. H., Llanos-Cuentas, A., & Vinetz, J. M. (2007). Short report: Polymerase chain reaction detection of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum DNA from stored serum samples: Implications for retrospective diagnosis of malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.444>
- Blauer, G. (1988). Interaction of ferriprotoporphyrin IX with the antimalarials amodiaquine and halofantrine. *Biochemistry International*.
- Bliss, C. M., Drammeh, A., Bowyer, G., Sanou, G. S., Jagne, Y. J., Ouedraogo, O., Edwards, N. J., Tarama, C., Ouedraogo, N., Ouedraogo, M., Njie-Jobe, J., Diarra, A., Afolabi, M. O., Tiono, A. B., Yaro, J. B., Adetifa, U. J., Hodgson, S. H., Anagnostou, N. A., Roberts, R., ... Ewer, K. J. (2017). Viral Vector Malaria Vaccines Induce High-Level T Cell and Antibody Responses in West African Children and Infants. *Molecular Therapy*. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.11.003>
- Bompart, F., Kiechel, J. R., Sebbag, R., & Pecoul, B. (2011). Innovative public-private partnerships to maximize the delivery of anti-malarial medicines: Lessons learned from the ASAQ Winthrop experience. *Malaria Journal*. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-143>
- Bousema, T., Okell, L., Felger, I., & Drakeley, C. (2014). Asymptomatic malaria infections: Detectability, transmissibility and public health relevance. In *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3364>
- Brasil, P., Zalis, M. G., de Pina-Costa, A., Siqueira, A. M., Júnior, C. B., Silva, S., Areas, A. L. L., Pelajo-Machado, M., de Alvarenga, D. A. M., da Silva Santelli, A. C. F., Albuquerque, H. G., Cravo, P., Santos de Abreu, F. V., Peterka, C. L., Zanini, G. M., Suárez Mutis, M. C., Pissinatti, A., Lourenço-de-Oliveira, R., de Brito, C. F. A., ... Daniel-Ribeiro, C. T. (2017). Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *The Lancet Global Health*. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30333-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30333-9)
- Brasseur, P., Druilhe, P., Kouamouo, J., Brandicourt, O., Danis, M., & Moyou, S. R. (1986). High level of sensitivity to chloroquine of 72 Plasmodium falciparum isolates from southern Cameroon in January 1985. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1986.35.711>
- Bunnag, D., Karbwang, J., Na-Bangchang, K., Thanavibul, A., Chittamas, S., & Harinasuta, T. (1996). Quinine-tetracycline for multidrug resistant falciparum malaria. *Southeast Asian Journal of*

- Capone, S., Reyes-Sandoval, A., Naddeo, M., Siani, L., Ammendola, V., Rollier, C. S., Nicosia, A., Colloca, S., Cortese, R., Folgori, A., & Hill, A. V. S. (2010). Immune responses against a liver-stage malaria antigen induced by simian adenoviral vector AdCh63 and MVA prime-boost immunisation in non-human primates. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.10.041>
- Chang, C., Lin-Hua, T., & Jantanavivat, C. (1992). Studies on a new antimalarial compound: Pyronaridine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(92\)90414-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(92)90414-8)
- Charles, J. F., & Nielsen-LeRoux, C. (2000). Mosquitocidal Bacterial Toxins: Diversity, Mode of Action and Resistance Phenomena. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000700034>
- Chavatte, J. M., Chiron, F., Chabaud, A., & Landau, I. (2007). Probable speciations by “Host-vector ‘fidélisation’”: 14 species of Plasmodium from magpies. *Parasite*. <https://doi.org/10.1051/parasite/2007141021>
- Chen, E., Salinas, N. D., Huang, Y., Ntumngia, F., Plasencia, M. D., Gross, M. L., Adams, J. H., & Tolia, N. H. (2016). Broadly neutralizing epitopes in the Plasmodium vivax vaccine candidate Duffy Binding Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600488113>
- Chen, I., Clarke, S. E., Gosling, R., Hamainza, B., Killeen, G., Magill, A., O’Meara, W., Price, R. N., & Riley, E. M. (2016). “Asymptomatic” Malaria: A Chronic and Debilitating Infection That Should Be Treated. *PLoS Medicine*. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001942>
- Chen, L., Qu, F. Y., & Zhou, Y. C. (1982). Field observations on the antimalarial piperaquine. *Chinese Medical Journal*.
- Chen, Lin, Lopaticki, S., Riglar, D. T., Dekiwadia, C., Uboldi, A. D., Tham, W. H., O’Neill, M. T., Richard, D., Baum, J., Ralph, S. A., & Cowman, A. F. (2011). An egf-like protein forms a complex with pfrh5 and is required for invasion of human erythrocytes by plasmodium falciparum. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002199>
- Choi, L., McIntyre, S., & Furnival-Adams, J. (2019). Indoor residual spraying for preventing malaria. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013300>
- Chotivanich, K., Silamut, K., Udomsangpetch, R., Stepniewska, K. A., Pukrittayakamee, S., Looareesuwan, S., & White, N. J. (2001). Ex-vivo short-term culture and developmental assessment of Plasmodium viva. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(01\)90113-0](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(01)90113-0)
- Chuang, I., Sedegah, M., Cicatelli, S., Spring, M., Polhemus, M., Tamminga, C., Patterson, N., Guerrero, M., Bennett, J. W., McGrath, S., Ganeshan, H., Belmonte, M., Farooq, F., Abot, E., Banania, J. G., Huang, J., Newcomer, R., Rein, L., Litilit, D., ... Richie, T. L. (2013). DNA Prime/Adenovirus Boost Malaria Vaccine Encoding P. falciparum CSP and AMA1 Induces Sterile Protection Associated with Cell-Mediated Immunity. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055571>
- Clendennen, T. E., Long, G. W., & Kevin Baird, J. (1995). QBC® and Giemsa-stained thick blood films: Diagnostic performance of laboratory technologists. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(95\)90486-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(95)90486-7)
- Collins, K. A., Snaith, R., Cottingham, M. G., Gilbert, S. C., & Hill, A. V. S. (2017). Enhancing protective immunity to malaria with a highly immunogenic virus-like particle vaccine. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep46621>

- Combrinck, J. M., Mabotha, T. E., Ncokazi, K. K., Ambele, M. A., Taylor, D., Smith, P. J., Hoppe, H. C., & Egan, T. J. (2013). Insights into the role of heme in the mechanism of action of antimalarials. *ACS Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1021/cb300454t>
- Cosgriff, T. M., Boudreau, E. F., Pamplin, C. L., Doberstyn, E. B., Desjardins, R. E., & Canfield, C. J. (1982). Evaluation of the antimalarial activity of the phenanthrenemethanol halofantrine (WR 171,669). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1982.31.1075>
- Croft, S. L., Duparc, S., Arbe-Barnes, S. J., Craft, J. C., Shin, C. S., Fleckenstein, L., Borghini-Fuhrer, I., & Rim, H. J. (2012). Review of pyronaridine anti-malarial properties and product characteristics. In *Malaria Journal*. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-270>
- Crosnier, C., Bustamante, L. Y., Bartholdson, S. J., Bei, A. K., Theron, M., Uchikawa, M., Mboup, S., Ndir, O., Kwiatkowski, D. P., Duraisingh, M. T., Rayner, J. C., & Wright, G. J. (2011). Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature10606>
- Curd, F. H. S., Davey, D. G., & Rose, F. L. (1945). Studies on synthetic antimalarial drugs. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. <https://doi.org/10.1080/00034983.1945.11685237>
- Davidson, G. (1957). Insecticide resistance in *Anopheles sundanicus*. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/1801333a0>
- Davies, D. H., Duffy, P., Bodmer, J. L., Felgner, P. L., & Doolan, D. L. (2015). Large screen approaches to identify novel malaria vaccine candidates. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.059>
- De Sousa, J. O., De Albuquerque, B. C., Coura, J. R., & Suárez-Mutis, M. C. (2019). Use and retention of long-lasting insecticidal nets (LLINs) in a malaria risk area in the Brazilian Amazon: A 5-year follow-up intervention. *Malaria Journal*. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2735-9>
- Deane, L. M. (1992). Simian malaria in Brazil. In *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761992000700001>
- Dinko, B., Oguike, M. C., Larbi, J. A., Bousema, T., & Sutherland, C. J. (2013). Persistent detection of *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* after ACT treatment of asymptomatic Ghanaian school-children. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2013.01.001>
- Doll, K. L., Pewe, L. L., Kurup, S. P., & Harty, J. T. (2016). Discriminating Protective from Nonprotective *Plasmodium* -Specific CD8 + T Cell Responses . *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600155>
- Doud, M. B., Koksai, A. C., Mi, L. Z., Song, G., Lu, C., & Springer, T. A. (2012). Unexpected fold in the circumsporozoite protein target of malaria vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205737109>
- Draper, S. J., Angov, E., Horii, T., Miller, L. H., Srinivasan, P., Theisen, M., & Biswas, S. (2015). Recent advances in recombinant protein-based malaria vaccines. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.093>
- Draper, S. J., Sack, B. K., King, C. R., Nielsen, C. M., Rayner, J. C., Higgins, M. K., Long, C. A., & Seder, R. A. (2018). Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. In *Cell Host and Microbe*. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.008>
- Eastman, R. T., & Fidock, D. A. (2009). Artemisinin-based combination therapies: A vital tool in efforts

- to eliminate malaria. In *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2239>
- Ebstie, Y. A., Abay, S. M., Tadesse, W. T., & Ejigu, D. A. (2016). Tafenoquine and its potential in the treatment and relapse prevention of *Plasmodium vivax* malaria: The evidence to date. In *Drug Design, Development and Therapy*. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S61443>
- Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: Final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. (2015). *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60721-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60721-8)
- Epstein, J. E., Tewari, K., Lyke, K. E., Sim, B. K. L., Billingsley, P. F., Laurens, M. B., Gunasekera, A., Chakravarty, S., James, E. R., Sedegah, M., Richman, A., Velmurugan, S., Reyes, S., Li, M., Tucker, K., Ahumada, A., Ruben, A. J., Li, T., Stafford, R., ... Hoffman, S. L. (2011). Live attenuated malaria vaccine designed to protect through hepatic CD8+ T cell immunity. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1211548>
- Espinosa, D. A., Gutierrez, G. M., Rojas-Lopez, M., Noe, A. R., Shi, L., Tse, S. W., Sinnis, P., & Zavala, F. (2015). Proteolytic Cleavage of the *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein Is a Target of Protective Antibodies. *Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv154>
- Ewer, K. J., O'Hara, G. A., Duncan, C. J. A., Collins, K. A., Sheehy, S. H., Reyes-Sandoval, A., Goodman, A. L., Edwards, N. J., Elias, S. C., Halstead, F. D., Longley, R. J., Rowland, R., Poulton, I. D., Draper, S. J., Blagborough, A. M., Berrie, E., Moyle, S., Williams, N., Siani, L., ... Hill, A. V. S. (2013). Protective CD8 + T-cell immunity to human malaria induced by chimpanzee adenovirus-MVA immunisation. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms3836>
- Ewer, K. J., Sierra-Davidson, K., Salman, A. M., Illingworth, J. J., Draper, S. J., Biswas, S., & Hill, A. V. S. (2015). Progress with viral vectored malaria vaccines: A multi-stage approach involving "unnatural immunity." *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.094>
- Fançon, C., Gamboa, D., Sebastião, Y., Hallett, R., Sutherland, C., Sousa-Figueiredo, J. C., & Nery, S. V. (2012). Various pfcrt and pfmdr1 genotypes of *Plasmodium falciparum* cocirculate with *P. malariae*, *P. ovale* spp., and *P. vivax* in Northern Angola. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00559-12>
- Fahrenhorst, M., Knols, B. G. J., Thomas, M. B., Howard, A. F. V., Takken, W., Rowland, M., & N'Guessan, R. (2010). Synergy in efficacy of fungal entomopathogens and permethrin against west african insecticide-resistant anopheles gambiae mosquitoes. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012081>
- Fernandez-Ruiz, D., Ng, W. Y., Holz, L. E., Ma, J. Z., Zaid, A., Wong, Y. C., Lau, L. S., Mollard, V., Cozijnsen, A., Collins, N., Li, J., Davey, G. M., Kato, Y., Devi, S., Skandari, R., Pauley, M., Manton, J. H., Godfrey, D. I., Braun, A., ... Heath, W. R. (2016). Liver-Resident Memory CD8+ T Cells Form a Front-Line Defense against Malaria Liver-Stage Infection. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.011>
- Fillinger, U., Knols, B. G. J., & Becker, N. (2003). Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var. israelensis and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. *Tropical Medicine and International Health*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2003.00979.x>
- Fitch, C. D. (2004). Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. In *Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.10.003>
- Francica, J. R., Zak, D. E., Linde, C., Siena, E., Johnson, C., Juraska, M., Yates, N. L., Gunn, B., De Gregorio, E., Flynn, B. J., Valiante, N. M., Malyala, P., Barnett, S. W., Sarkar, P., Singh, M., Jain, S., Ackerman,

- M., Alam, M., Ferrari, G., ... Seder, R. A. (2017). Innate transcriptional effects by adjuvants on the magnitude, quality, and durability of HIV envelope responses in NHPs. *Blood Advances*. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017011411>
- Fry, M., & Pudney, M. (1992). Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3- hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochemical Pharmacology*. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(92\)90213-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(92)90213-3)
- Galaway, F., Drought, L. G., Fala, M., Cross, N., Kemp, A. C., Rayner, J. C., & Wright, G. J. (2017). P113 is a merozoite surface protein that binds the N terminus of Plasmodium falciparum RH5. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms14333>
- Garrido-Cardenas, J. A., González-Cerón, L., Manzano-Agugliaro, F., & Mesa-Valle, C. (2019). Plasmodium genomics: an approach for learning about and ending human malaria. *Parasitology Research*. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6127-9>
- Genito, C. J., Beck, Z., Phares, T. W., Kalle, F., Limbach, K. J., Stefaniak, M. E., Patterson, N. B., Bergmann-Leitner, E. S., Waters, N. C., Matyas, G. R., Alving, C. R., & Dutta, S. (2017). Liposomes containing monophosphoryl lipid A and QS-21 serve as an effective adjuvant for soluble circumsporozoite protein malaria vaccine FMP013. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.05.070>
- Gilbert, L. I., & Gill, S. S. (2010). Insect Control, Biological and Synthetic Agents. In *Comprehensive Molecular Insect Science*. <https://doi.org/10.1016/B0-44-451924-6/00088-0>
- Gilson, P. R., & Crabb, B. S. (2009). Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by Plasmodium falciparum merozoites. *International Journal for Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.09.007>
- Ginouves, M., Veron, V., Musset, L., Legrand, E., Stefani, A., Prevot, G., Demar, M., Djossou, F., Brousse, P., Nacher, M., & Carme, B. (2015). Frequency and distribution of mixed Plasmodium falciparum-vivax infections in French Guiana between 2000 and 2008. *Malaria Journal*. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0971-1>
- Girard, M. P., Reed, Z. H., Friede, M., & Kieny, M. P. (2007). A review of human vaccine research and development: Malaria. In *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.09.074>
- Godfray, H. C. J. (2013). Mosquito ecology and control of malaria. *Journal of Animal Ecology*. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12003>
- Gomes, P. S., Bhardwaj, J., Rivera-Correa, J., Freire-De-Lima, C. G., & Morrot, A. (2016). Immune escape strategies of malaria parasites. In *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01617>
- González-Romo, F., & Picazo, J. J. (2015). El desarrollo de nuevas vacunas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.06.013>
- Guerra Mendoza, Y., Garric, E., Leach, A., Lievens, M., Ofori-Anyinam, O., Pirçon, J. Y., Stegmann, J. U., Vandoolaeghe, P., Otieno, L., Otieno, W., Owusu-Agyei, S., Sacarlal, J., Masoud, N. S., Sorgho, H., Tanner, M., Tinto, H., Valea, I., Mtoro, A. T., Njuguna, P., ... Schuerman, L. (2019). Safety profile of the RTS,S/AS01 malaria vaccine in infants and children: additional data from a phase III randomized controlled trial in sub-Saharan Africa. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1586040>
- Guillet, P., Kurtak, D. C., Philippon, B., & Meyer, R. (1990). Use of Bacillus thuringiensis israelensis for Onchocerciasis Control in West Africa. In *Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies*. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5967-8_11

- Guimarães, L. O., Bajay, M. M., Wunderlich, G., Bueno, M. G., Röhe, F., Catão-Dias, J. L., Neves, A., Malafronte, R. S., Curado, I., & Kirchgatter, K. (2012). The genetic diversity of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum* from human, simian and mosquito hosts in Brazil. *Acta Tropica*. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.05.016>
- Gural, N., Mancio-Silva, L., Miller, A. B., Galstian, A., Butty, V. L., Levine, S. S., Patrapuvich, R., Desai, S. P., Mikolajczak, S. A., Kappe, S. H. I., Fleming, H. E., March, S., Sattabongkot, J., & Bhatia, S. N. (2018). In Vitro Culture, Drug Sensitivity, and Transcriptome of *Plasmodium Vivax* Hypnozoites. *Cell Host and Microbe*. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.01.002>
- Hall, N., Karras, M., Raine, J. D., Carlton, J. M., Kooij, T. W. A., Berriman, M., Florens, L., Janssen, C. S., Pain, A., Christophides, G. K., James, K., Rutherford, K., Harris, B., Harris, D., Churcher, C., Quail, M. A., Ormond, D., Doggett, J., Trueman, H. E., ... Sinden, R. E. (2005). A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. In *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1103717>
- Hartmeyer, G. N., Stensvold, C. R., Fabricius, T., Marmolin, E. S., Hoegh, S. V., Nielsen, H. V., Kemp, M., & Vestergaard, L. S. (2019). *Plasmodium cynomolgi* as Cause of Malaria in Tourist to Southeast Asia, 2018. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid2510.190448>
- Hawkes, M., & Kain, K. C. (2007). Advances in malaria diagnosis. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. <https://doi.org/10.1586/14787210.5.3.485>
- Hay, S. I., Sinka, M. E., Okara, R. M., Kabaria, C. W., Mbithi, P. M., Tago, C. C., Benz, D., Gething, P. W., Howes, R. E., Patil, A. P., Temperley, W. H., Bangs, M. J., Chareonviriyaphap, T., Elyazar, I. R. F., Harbach, R. E., Hemingway, J., Manguin, S., Mbogo, C. M., Rubio-Palis, Y., & Godfray, H. C. J. (2010). Developing global maps of the dominant anopheles vectors of human malaria. *PLoS Medicine*. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000209>
- Herdiana, H., Cotter, C., Coutrier, F. N., Zarlinda, I., Zelman, B. W., Tirta, Y. K., Greenhouse, B., Gosling, R. D., Baker, P., Whittaker, M., & Hsiang, M. S. (2016). Malaria risk factor assessment using active and passive surveillance data from Aceh Besar, Indonesia, a low endemic, malaria elimination setting with *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1523-z>
- Hester, J., Chan, E. R., Menard, D., Mercereau-Puijalon, O., Barnwell, J., Zimmerman, P. A., & Serre, D. (2013). De Novo Assembly of a Field Isolate Genome Reveals Novel *Plasmodium vivax* Erythrocyte Invasion Genes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002569>
- Hodgson, S. H., Ewer, K. J., Bliss, C. M., Edwards, N. J., Rampling, T., Anagnostou, N. A., De Barra, E., Havelock, T., Bowyer, G., Poulton, I. D., De Cassan, S., Longley, R., Illingworth, J. J., Douglas, A. D., Mange, P. B., Collins, K. A., Roberts, R., Gerry, S., Berrie, E., ... Hill, A. V. S. (2015). Evaluation of the efficacy of ChAd63-MVA vectored vaccines expressing circumsporozoite protein and ME-TRAP against controlled human malaria infection in malaria-naïve individuals. *Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu579>
- Hoffman, S. L., Goh, L. M. L., Luke, T. C., Schneider, I., Le, T. P., Doolan, D. L., Sacchi, J., de la Vega, P., Dowler, M., Paul, C., Gordon, D. M., Stoute, J. A., Church, L. W. P., Sedegah, M., Heppner, D. G., Ballou, W. R., & Richie, T. L. (2002). Protection of Humans against Malaria by Immunization with Radiation-Attenuated *Plasmodium falciparum* Sporozoites. *The Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1086/339409>
- Hoffman, S. L., Vekemans, J., Richie, T. L., & Duffy, P. E. (2015). The March Toward Malaria Vaccines. In *American Journal of Preventive Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2015.09.011>

- Hostetler, J. B., Lo, E., Kanjee, U., Amaratunga, C., Suon, S., Sreng, S., Mao, S., Yewhalaw, D., Mascarenhas, A., Kwiatkowski, D. P., Ferreira, M. U., Rathod, P. K., Yan, G., Fairhurst, R. M., Duraisingh, M. T., & Rayner, J. C. (2016). Independent Origin and Global Distribution of Distinct *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein Gene Duplications. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005091>
- Howard, A. F. V., Koenraadt, C. J. M., Farenhorst, M., Knols, B. G. J., & Takken, W. (2010). Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* leads to increased susceptibility to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Malaria Journal*. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-168>
- Huang, J., Tsao, T., Zhang, M., Rai, U., Tsuji, M., & Li, X. (2015). A sufficient role of MHC class I molecules on hepatocytes in anti-plasmodial activity of CD8+ T cells in vivo. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00069>
- Hudson, A., & Randall, A. (1991). *Naphthoquinone derivatives* (Patent No. US5053432A).
- Imwong, M., Madmanee, W., Suwannasin, K., Kunasol, C., Peto, T. J., Tripura, R., Von Seidlein, L., Nguon, C., Davoeung, C., Day, N. P. J., Dondorp, A. M., & White, N. J. (2019). Asymptomatic natural human infections with the simian malaria parasites *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium knowlesi*. *Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy519>
- Imwong, M., Nakeesathit, S., Day, N. P. J., & White, N. J. (2011). A review of mixed malaria species infections in anopheline mosquitoes. In *Malaria Journal*. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-253>
- Imwong, M., Pukrittayakamee, S., Pongtavornpinyo, W., Nakeesathit, S., Nair, S., Newton, P., Nosten, F., Anderson, T. J. C., Dondorp, A., Day, N. P. J., & White, N. J. (2008). Gene amplification of the multidrug resistance 1 gene of *Plasmodium vivax* isolates from Thailand, Laos, and Myanmar. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.01459-07>
- Itoe, M. A., Sampaio, J. L., Cabal, G. G., Real, E., Zuzarte-Luis, V., March, S., Bhatia, S. N., Frischknecht, F., Thiele, C., Shevchenko, A., & Mota, M. M. (2014). Host cell phosphatidylcholine is a key mediator of malaria parasite survival during liver stage infection. *Cell Host and Microbe*. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.006>
- Kamareddine, L. (2012). The biological control of the malaria vector. In *Toxins*. <https://doi.org/10.3390/toxins4090748>
- Kapishnikov, S., Staalsø, T., Yang, Y., Lee, J., Pérez-Berná, A. J., Pereiro, E., Yang, Y., Werner, S., Guttman, P., Leiserowitz, L., & Als-Nielsen, J. (2019). Mode of action of quinoline antimalarial drugs in red blood cells infected by *Plasmodium falciparum* revealed in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910123116>
- Kappe, S. H. I., Vaughan, A. M., Boddey, J. A., & Cowman, A. F. (2010). That was then but this is now: Malaria research in the time of an eradication agenda. In *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1184785>
- Kapulu, M. C., Da, D. F., Miura, K., Li, Y., Blagborough, A. M., Churcher, T. S., Nikolaeva, D., Williams, A. R., Goodman, A. L., Sangare, I., Turner, A. V., Cottingham, M. G., Nicosia, A., Straschil, U., Tsuboi, T., Gilbert, S. C., Long, C. A., Sinden, R. E., Draper, S. J., ... Biswas, S. (2015). Comparative assessment of transmission-blocking vaccine candidates against *Plasmodium falciparum*. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep11193>
- Kazmin, D., Nakaya, H. I., Lee, E. K., Johnson, M. J., Van Der Most, R., Van Den Berg, R. A., Ballou, W.

- R., Jongert, E., Wille-Reece, U., Ockenhouse, C., Aderem, A., Zak, D. E., Sadoff, J., Hendriks, J., Wrammert, J., Ahmed, R., & Pulendran, B. (2017). Systems analysis of protective immune responses to RTS,S malaria vaccination in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621489114>
- Kim, S. H., Nam, M. H., Roh, K. H., Park, H. C., Nam, D. H., Park, G. H., Han, E. T., Klein, T. A., & Lim, C. S. (2008). Evaluation of a rapid diagnostic test specific for *Plasmodium vivax*. *Tropical Medicine and International Health*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2008.02163.x>
- Koch, M., & Baum, J. (2016). The mechanics of malaria parasite invasion of the human erythrocyte - towards a reassessment of the host cell contribution. In *Cellular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/cmi.12557>
- Kublin, J. G., Mikolajczak, S. A., Sack, B. K., Fishbaugher, M. E., Seilie, A., Shelton, L., VonGoedert, T., Firat, M., Magee, S., Fritzen, E., Betz, W., Kain, H. S., Dankwa, D. A., Steel, R. W. J., Vaughan, A. M., Sather, D. N., Murphy, S. C., & Kappe, S. H. I. (2017). Complete attenuation of genetically engineered *Plasmodium falciparum* sporozoites in human subjects. *Science Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad9099>
- Kwong, P. D. (2017). What are the most powerful immunogen design vaccine strategies?: A structural biologist's perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029470>
- Laing, A. B. (1965). Treatment of acute falciparum malaria with diaphenylsulfone in North-East Tanzania. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.
- Lalremruata, A., Magris, M., Vivas-Martínez, S., Koehler, M., Esen, M., Kempaiah, P., Jeyaraj, S., Perkins, D. J., Mordmüller, B., & Metzger, W. G. (2015). Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. *EBioMedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.07.033>
- Lee, A. H., Symington, L. S., & Fidock, D. A. (2014). DNA Repair Mechanisms and Their Biological Roles in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00059-13>
- Lindblade, K. A., Steinhardt, L., Samuels, A., Kachur, S. P., & Slutsker, L. (2013). The silent threat: Asymptomatic parasitemia and malaria transmission. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. <https://doi.org/10.1586/eri.13.45>
- Loeb, R. F., McCoy, O. R., Clark, W. M., Coatney, G. R., Coggeshall, L. T., Dieuaide, F. R., Dochez, A. R., Hakansson, E. G., Marshall, E. K., Marvel, C. S., Saper, J. J., Sebrell, W. H., Shannon, J. A., & Carden, G. A. (1946). Activity of a new antimalarial agent, chloroquine (sn 7618): Statement approved by the board for coordination of malarial studies. *Journal of the American Medical Association*. <https://doi.org/10.1001/jama.1946.02870160015006>
- Longley, R. J., Hill, A. V. S., & Spencer, A. J. (2015). Malaria vaccines: Identifying *Plasmodium falciparum* liver-stage targets. In *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00965>
- Lubanga, B., Chemtai, A., & Kwaro, D. (2016). THE RTS , S / AS MALARIA VACCINE CANDIDATE : A STATUS REVIEW. *International Journal of Medicine & Health Research*.
- Lumb, V., Das, M. K., Singh, N., Dev, V., Khan, W., & Sharma, Y. D. (2011). Multiple origins of *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthetase mutant alleles associated with sulfadoxine resistance in India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.01151-10>
- Mabaso, M. L. H., Sharp, B., & Lengeler, C. (2004). Historical review of malarial control in southern

- African with emphasis on the use of indoor residual house-spraying. In *Tropical Medicine and International Health*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2004.01263.x>
- MacDonald, N. J., Nguyen, V., Shimp, R., Reiter, K., Herrera, R., Burkhardt, M., Muratova, O., Kumar, K., Aebig, J., Rausch, K., Lambert, L., Dawson, N., Sattabongkot, J., Ambroggio, X., Duffy, P. E., Wu, Y., & Narum, D. L. (2016). Structural and immunological characterization of recombinant 6-cysteine domains of the plasmodium falciparum sexual stage protein Pfs230. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.732305>
- Malaria vaccine: WHO position paper-January 2016. (2016). *Relevé Épidémiologique Hebdomadaire / Section d'hygiène Du Secrétariat de La Société Des Nations = Weekly Epidemiological Record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations*.
- Malleret, B., Li, A., Zhang, R., Tan, K. S. W., Suwanarusk, R., Claser, C., Cho, J. S., Koh, E. G. L., Chu, C. S., Pukrittayakamee, S., Ng, M. L., Ginhoux, F., Ng, L. G., Lim, C. T., Nosten, F., Snounou, G., Rénia, L., & Russell, B. (2015). Plasmodium vivax: Restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-596015>
- Markus, M. B. (2011). The hypnozoite concept, with particular reference to malaria. *Parasitology Research*. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2072-y>
- McCutchan, T. F., Piper, R. C., & Makler, M. T. (2008). Use of malaria rapid diagnostic test to identify Plasmodium knowlesi infection. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid1411.080840>
- McMorrow, M. L., Masanja, M. I., Abdulla, S. M. K., Kahigwa, E., & Kachur, S. P. (2008). Challenges in routine implementation and quality control of rapid diagnostic tests for malaria-Rufiji District, Tanzania. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.79.385>
- Menard, D., Chan, E. R., Benedet, C., Ratsimbaoa, A., Kim, S., Chim, P., Do, C., Witkowski, B., Durand, R., Thellier, M., Severini, C., Legrand, E., Musset, L., Nour, B. Y. M., Mercereau-Puijalon, O., Serre, D., & Zimmerman, P. A. (2013). Whole Genome Sequencing of Field Isolates Reveals a Common Duplication of the Duffy Binding Protein Gene in Malagasy Plasmodium vivax Strains. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002489>
- Mens, P. F., Schoone, G. J., Kager, P. A., & Schallig, H. D. F. H. (2006). Detection and identification of human Plasmodium species with real-time quantitative nucleic acid sequence-based amplification. *Malaria Journal*. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-5-80>
- Mens, P. F., van Amerongen, A., Sawa, P., Kager, P. A., & Schallig, H. D. F. H. (2008). Molecular diagnosis of malaria in the field: development of a novel 1-step nucleic acid lateral flow immunoassay for the detection of all 4 human Plasmodium spp. and its evaluation in Mbita, Kenya. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.03.009>
- Mensah, V. A., Gueye, A., Ndiaye, M., Edwards, N. J., Wright, D., Anagnostou, N. A., Syll, M., Ndaw, A., Abiola, A., Bliss, C., Gomis, J. F., Petersen, I., Ogwang, C., Dieye, T., Viebig, N. K., Lawrie, A. M., Roberts, R., Nicosia, A., Faye, B., ... Cisse, B. (2016). Safety, immunogenicity and efficacy of prime-Boost vaccination with chad63 and mva encoding me-trap against plasmodium falciparum infection in adults in senegal. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167951>
- Merritt, R. W. (1993). The Biology of Mosquitoes, Volume 1: Development, Nutrition, and Reproduction . A. N. Clements . *Journal of the North American Benthological Society*. <https://doi.org/10.2307/1467467>
- Millar, S. B., & Cox-Singh, J. (2015). Human infections with Plasmodium knowlesi-zoonotic malaria. In

- Mlambo, G., Vasquez, Y., LeBlanc, R., Sullivan, D., & Kumar, N. (2008). Short report: A filter paper method for the detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes by reverse transcription-polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.78.114>
- Molina-Cruz, A., Garver, L. S., Alabaster, A., Bangiolo, L., Haile, A., Winikor, J., Ortega, C., Van Schaijk, B. C. L., Sauerwein, R. W., Taylor-Salmon, E., & Barillas-Mury, C. (2013). The human malaria parasite Pfs47 gene mediates evasion of the mosquito immune system. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1235264>
- Montagna, G. N., Beigier-Bompadre, M., Becker, M., Kroczeck, R. A., Kaufmann, S. H. E., & Matuschewski, K. (2014). Antigen export during liver infection of the malaria parasite augments protective immunity. *MBio*. <https://doi.org/10.1128/mBio.01321-14>
- Moody, A. (2002). Rapid diagnostic tests for malaria parasites. In *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.1.66-78.2002>
- Moorthy, V. S., Newman, R. D., & Okwo-Bele, J. M. (2013). Malaria vaccine technology roadmap. In *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62238-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62238-2)
- Morassin, B., Fabre, R., Berry, A., & Magnaval, J. F. (2002). One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.503>
- Mueller, I., Shakri, A. R., & Chitnis, C. E. (2015). Development of vaccines for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.060>
- Mwangi, T. W., Mohammed, M., Dayo, H., Snow, R. W., & Marsh, K. (2005). Clinical algorithms for malaria diagnosis lack utility among people of different age groups. *Tropical Medicine and International Health*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2005.01439.x>
- Naing, C., Whittaker, M. A., Nyunt Wai, V., & Mak, J. W. (2014). Is *Plasmodium vivax* Malaria a Severe Malaria?: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003071>
- Nájera, J. A., González-Silva, M., & Alonso, P. L. (2011). Some lessons for the future from the global malaria eradication programme (1955-1969). In *PLoS Medicine*. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000412>
- Neafsey, D. E., Juraska, M., Bedford, T., Benkeser, D., Valim, C., Griggs, A., Lievens, M., Abdulla, S., Adjei, S., Agbenyega, T., Agnandji, S. T., Aide, P., Anderson, S., Ansong, D., Aponte, J. J., Asante, K. P., Bejon, P., Birkett, A. J., Bruls, M., ... Wirth, D. F. (2015). Genetic diversity and protective efficacy of the RTS,S/AS01 malaria vaccine. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1505819>
- Nevin, R. L., & Croft, A. M. (2016). Psychiatric effects of malaria and anti-malarial drugs: Historical and modern perspectives. In *Malaria Journal*. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1391-6>
- Ngasala, B., Mubi, M., Warsame, M., Petzold, M. G., Masele, A. Y., Gustafsson, L. L., Tomson, G., Premji, Z., & Bjorkman, A. (2008). Impact of training in clinical and microscopy diagnosis of childhood malaria on antimalarial drug prescription and health outcome at primary health care level in Tanzania: A randomized controlled trial. *Malaria Journal*. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-199>
- Noedl, H., Se, Y., Schaecher, K., Smith, B. L., Socheat, D., & Fukuda, M. M. (2008). Evidence of

- artemisinin-resistant malaria in Western Cambodia. In *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0805011>
- Nussenzweig, R. S., Vanderberg, J., Most, H., & Orton, C. (1967). Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of plasmodium berghei. In *Nature*. <https://doi.org/10.1038/216160a0>
- O'Neill, P. M., Barton, V. E., & Ward, S. A. (2010). The molecular mechanism of action of artemisinin - The debate continues. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules15031705>
- Ochola, L., Vounatsou, P., Smith, T., Mabaso, M., & Newton, C. (2006). The reliability of diagnostic techniques in the diagnosis and management of malaria in the absence of a gold standard. In *Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70579-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70579-5)
- Ogwang, C., Kimani, D., Edwards, N. J., Roberts, R., Mwacharo, J., Bowyer, G., Bliss, C., Hodgson, S. H., Njuguna, P., Viebig, N. K., Nicosia, A., Gitau, E., Douglas, S., Illingworth, J., Marsh, K., Lawrie, A., Imoukhuede, E. B., Ewer, K., Urban, B. C., ... Ogutu, B. (2015). Prime-boost vaccination with chimpanzee adenovirus and modified vaccinia Ankara encoding TRAP provides partial protection against Plasmodium falciparum infection in Kenyan adults. *Science Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa2373>
- Okumu, F. O., Madumla, E. P., John, A. N., Lwetoijera, D. W., & Sumaye, R. D. (2010). Attracting, trapping and killing disease-transmitting mosquitoes using odor-baited stations - The Ifakara Odor-Baited Stations. *Parasites and Vectors*. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-12>
- Oyen, D., Torres, J. L., Wille-Reece, U., Ockenhouse, C. F., Emerling, D., Glanville, J., Volkmuth, W., Flores-Garcia, Y., Zavala, F., Ward, A. B., Richter King, C., & Wilson, I. A. (2017). Structural basis for antibody recognition of the NANP repeats in Plasmodium falciparum circumsporozoite protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715812114>
- Park, J. W., Yoo, S. B., Oh, J. H., Yeom, J. S., Lee, Y. H., Bahk, Y. Y., Kim, Y. S., & Lim, K. J. (2008). Diagnosis of vivax malaria using an IgM capture ELISA is a sensitive method, even for low levels of parasitemia. *Parasitology Research*. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1023-3>
- Park, T. S., Kim, J. H., Kang, C. I., Lee, B. H., Jeon, B. R., Lee, S. M., Chang, C. L., Lee, E. Y., Son, H. C., & Kim, H. H. (2006). Diagnostic Usefulness of SD Malaria Antigen and Antibody Kits for Differential Diagnosis of vivax Malaria in Patients with Fever of Unknown Origin. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2006.26.4.241>
- Payne, D. (1988). Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bulletin of the World Health Organization*.
- Payne, R. O., Silk, S. E., Elias, S. C., Milne, K. H., Rawlinson, T. A., Llewellyn, D., Shakri, A. R., Jin, J., Labbé, G. M., Edwards, N. J., Poulton, I. D., Roberts, R., Farid, R., Jørgensen, T., Alanine, D. G., de Cassan, S. C., Higgins, M. K., Otto, T. D., McCarthy, J. S., ... Draper, S. J. (2017). Human vaccination against Plasmodium vivax Duffy-binding protein induces strain-transcending antibodies. *JCI Insight*. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93683>
- Pehrson, C., Salanti, A., Theander, T. G., & Nielsen, M. A. (2017). Pre-clinical and clinical development of the first placental malaria vaccine. In *Expert Review of Vaccines*. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1322512>
- Phillips, M. A., Burrows, J. N., Manyando, C., Van Huijsduijnen, R. H., Van Voorhis, W. C., & Wells, T. N. C. (2017). Malaria. *Nature Reviews Disease Primers*. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.50>
- Pirahmadi, S., Zakeri, S., Mehrizi, A. A., & Djadid, N. D. (2018). Analysis of genetic diversity and

- population structure of gene encoding cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites (CelTOS) vaccine candidate antigen in global *Plasmodium falciparum* populations. *Infection, Genetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.01.023>
- Polpanich, D., Tangboriboonrat, P., Elaissari, A., & Udomsangpetch, R. (2007). Detection of malaria infection via latex agglutination assay. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/ac070502w>
- Qinghaosu Antimalaria Coordinating Research Group. (1979). Antimalaria studies on Qinghaosu. *Chinese Medical Journal*.
- Raja, A. I., Stanisic, D. I., & Good, M. F. (2017). Chemical attenuation in the development of a whole-organism malaria vaccine. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.00062-17>
- Ramasamy, R. (2014). Zoonotic malaria - global overview and research and policy needs. In *Frontiers in Public Health*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00123>
- Ramplung, T., Ewer, K. J., Bowyer, G., Bliss, C. M., Edwards, N. J., Wright, D., Payne, R. O., Venkatraman, N., De Barra, E., Snudden, C. M., Poulton, I. D., De Graaf, H., Sukhtankar, P., Roberts, R., Iverson, K., Weltzin, R., Rajkumar, B. Y., Wille-Reece, U., Lee, C. K., ... Hill, A. V. S. (2016). Safety and high level efficacy of the combination malaria vaccine regimen of RTS,S/AS01B with chimpanzee adenovirus 63 and modified vaccinia Ankara vectored vaccines expressing me-trap. *Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw244>
- Reddy, K. S., Amlabu, E., Pandey, A. K., Mitra, P., Chauhan, V. S., & Gaur, D. (2015). Multiprotein complex between the GPI-anchored CyRPA with PfRH5 and PfRipr is crucial for *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415466112>
- Regules, J. A., Cicatelli, S. B., Bennett, J. W., Paolino, K. M., Twomey, P. S., Moon, J. E., Kathcart, A. K., Hauns, K. D., Komisar, J. L., Qabar, A. N., Davidson, S. A., Dutta, S., Griffith, M. E., Magee, C. D., Wojnarski, M., Livezey, J. R., Kress, A. T., Waterman, P. E., Jongert, E., ... Vekemans, J. (2016). Fractional third and fourth dose of RTS,S/AS01 malaria candidate vaccine: A phase 2a controlled human malaria parasite infection and immunogenicity study. *Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw237>
- Reyburn, H., Mbatia, R., Drakeley, C., Carneiro, I., Mwakasungula, E., Mwerinde, O., Saganda, K., Shao, J., Kitua, A., Olomi, R., Greenwood, B. M., & Whitty, C. J. M. (2004). Overdiagnosis of malaria in patients with severe febrile illness in Tanzania: A prospective study. *British Medical Journal*. <https://doi.org/10.1136/bmj.38251.658229.55>
- Rieckmann, K. H., Beaudoin, R. L., Cassells, J. S., & Sell, K. W. (1979). Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against falciparum malaria. *Bulletin of the World Health Organization*.
- Roestenberg, M., Teirlinck, A. C., McCall, M. B. B., Teelen, K., Makamdop, K. N., Wiersma, J., Arens, T., Beckers, P., Van Gemert, G., Van De Vegte-Bolmer, M., Van Der Ven, A. J. A. M., Luty, A. J. F., Hermesen, C. C., & Sauerwein, R. W. (2011). Long-term protection against malaria after experimental sporozoite inoculation: An open-label follow-up study. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60360-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60360-7)
- Roux, O., & Robert, V. (2019). Larval predation in malaria vectors and its potential implication in malaria transmission: An overlooked ecosystem service? In *Parasites and Vectors*. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3479-7>
- Russell, P. B., & Hitchings, G. H. (1951). 2,4-Diaminopyrimidines as Antimalarials. III. 5-Aryl Derivatives. *Journal of the American Chemical Society*. <https://doi.org/10.1021/ja01152a060>

- Salman, A. M., Montoya-Díaz, E., West, H., Lall, A., Atcheson, E., Lopez-Camacho, C., Ramesar, J., Bauza, K., Collins, K. A., Brod, F., Reis, F., Pappas, L., González-Cerón, L., Janse, C. J., Hill, A. V. S., Khan, S. M., & Reyes-Sandoval, A. (2017). Rational development of a protective *P. vivax* vaccine evaluated with transgenic rodent parasite challenge models. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep46482>
- Scally, S. W., McLeod, B., Bosch, A., Miura, K., Liang, Q., Carroll, S., Reponen, S., Nguyen, N., Giladi, E., Rämisch, S., Yusibov, V., Bradley, A., Lemiale, F., Schief, W. R., Emerling, D., Kellam, P., King, C. R., & Julien, J. P. (2017). Molecular definition of multiple sites of antibody inhibition of malaria transmission-blocking vaccine antigen Pfs25. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01924-3>
- Scally, S. W., Murugan, R., Bosch, A., Triller, G., Costa, G., Mordmüller, B., Kremsner, P. G., Sim, B. K. L., Hoffman, S. L., Levashina, E. A., Wardemann, H., & Julien, J. P. (2018). Rare PfCSP C-terminal antibodies induced by live sporozoite vaccination are ineffective against malaria infection. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20170869>
- Scholte, E.-J., Knols, B. G. J., Samson, R. A., & Takken, W. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of Insect Science*. <https://doi.org/10.1093/jis/4.1.19>
- Scholte, E. J., Ng'Habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaïmans, K., Abdulla, S., Killeen, G. F., & Knols, B. G. J. (2005). An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1108639>
- Seder, R. A., Chang, L. J., Enama, M. E., Zephir, K. L., Sarwar, U. N., Gordon, I. J., Holman, L. S. A., James, E. R., Billingsley, P. F., Gunasekera, A., Richman, A., Chakravarty, S., Manoj, A., Velmurugan, S., Li, M. L., Ruben, A. J., Li, T., Eappen, A. G., Stafford, R. E., ... Hoffman, S. L. (2013). Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1241800>
- Sei, W. L., Jeon, K., Byung, R. J., & Park, I. (2008). Rapid diagnosis of vivax malaria by the SD bioline malaria antigen test when thrombocytopenia is present. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.02110-07>
- Seydel, K. B., Kampondeni, S. D., Valim, C., Potchen, M. J., Milner, D. A., Muwalo, F. W., Birbeck, G. L., Bradley, W. G., Fox, L. L., Glover, S. J., Hammond, C. A., Heyderman, R. S., Chilingulo, C. A., Molyneux, M. E., & Taylor, T. E. (2015). Brain swelling and death in children with cerebral malaria. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1400116>
- She, R. C., Rawlins, M. L., Mohl, R., Perkins, S. L., Hill, H. R., & Litwin, C. M. (2007). Comparison of immunofluorescence antibody testing and two enzyme immunoassays in the serologic diagnosis of malaria. *Journal of Travel Medicine*. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.2006.00087.x>
- Sherrard-Smith, E., Sala, K. A., Betancourt, M., Upton, L. M., Angrisano, F., Morin, M. J., Ghani, A. C., Churcher, T. S., & Blagborough, A. M. (2018). Synergy in anti-malarial pre-erythrocytic and transmission-blocking antibodies is achieved by reducing parasite density. *eLife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.35213>
- Silvie, O., Mota, M. M., Matuschewski, K., & Prudêncio, M. (2008). Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. In *Current Opinion in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.005>
- Singh, B., Sung, L. K., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S. S. G., Cox-Singh, J., Thomas, A., & Conway, D. J. (2004). A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15836-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15836-4)

- Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Coetzee, M., Mbogo, C. M., Hemingway, J., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., Kabaria, C. W., Okara, R. M., Van Boeckel, T., Godfray, H. C. J., Harbach, R. E., & Hay, S. I. (2010). The dominant Anopheles vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: Occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites and Vectors*. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-117>
- Siqueira, A. M., Mesones-Lapouble, O., Marchesini, P., Sampaio, V. D. S., Brasil, P., Tauil, P. L., Fontes, C. J., Costa, F. T. M., Daniel-Ribeiro, C. T., Lacerda, M. V. G., Damasceno, C. P., & Santelli, A. C. S. (2016). Plasmodium vivax landscape in Brazil: Scenario and challenges. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0204>
- Sirima, S. B., Durier, C., Kara, L., Houard, S., Gansane, A., Loulergue, P., Bahuaud, M., Benhamouda, N., Nebié, I., Faber, B., Remarque, E., Launay, O., Ouedraogo, E., Sanou, G., Gueguen, S., Lopez Perez, E., Ammour, K., Kocken, C., Batteux, F., & Tartour, E. (2017). Safety and immunogenicity of a recombinant Plasmodium falciparum AMA1-DiCo malaria vaccine adjuvanted with GLA-SE or Alhydrogel® in European and African adults: A phase 1a/1b, randomized, double-blind multi-centre trial. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.027>
- Sissoko, M. S., Healy, S. A., Katile, A., Omaswa, F., Zaidi, I., Gabriel, E. E., Kamate, B., Samake, Y., Guindo, M. A., Dolo, A., Niangaly, A., Niaré, K., Zeguime, A., Sissoko, K., Diallo, H., Thera, I., Ding, K., Fay, M. P., O'Connell, E. M., ... Duffy, P. E. (2017). Safety and efficacy of PfSPZ Vaccine against Plasmodium falciparum via direct venous inoculation in healthy malaria-exposed adults in Mali: a randomised, double-blind phase 1 trial. *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30104-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30104-4)
- Spring, M., Murphy, J., Nielsen, R., Dowler, M., Bennett, J. W., Zarling, S., Williams, J., de la Vega, P., Ware, L., Komisar, J., Polhemus, M., Richie, T. L., Epstein, J., Tamminga, C., Chuang, I., Richie, N., O'Neil, M., Heppner, D. G., Healer, J., ... Kappe, S. H. I. (2013). First-in-human evaluation of genetically attenuated Plasmodium falciparum sporozoites administered by bite of Anopheles mosquitoes to adult volunteers. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.08.007>
- Srinivasan, P., Baldeviano, G. C., Miura, K., Diouf, A., Ventocilla, J. A., Leiva, K. P., Lugo-Roman, L., Lucas, C., Orr-Gonzalez, S., Zhu, D., Villasante, E., Soisson, L., Narum, D. L., Pierce, S. K., Long, C. A., Diggs, C., Duffy, P. E., Lescano, A. G., & Miller, L. H. (2017). A malaria vaccine protects Aotus monkeys against virulent Plasmodium falciparum infection. *Npj Vaccines*. <https://doi.org/10.1038/s41541-017-0015-7>
- Srivastava, I. K., & Vaidya, A. B. (1999). A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/aac.43.6.1334>
- Stone, W. J. R., Campo, J. J., Ouédraogo, A. L., Meerstein-Kessel, L., Morlais, I., Da, D., Cohuet, A., Nsango, S., Sutherland, C. J., Van De Vegte-Bolmer, M., Siebelink-Stoter, R., Van Gemert, G. J., Graumans, W., Lanke, K., Shandling, A. D., Pablo, J. V., Teng, A. A., Jones, S., De Jong, R. M., ... Jore, M. M. (2018). Unravelling the immune signature of Plasmodium falciparum transmission-reducing immunity. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02646-2>
- Su, X. Z., Lane, K. D., Xia, L., Sá, J. M., & Wellems, T. E. (2019). Plasmodium genomics and genetics: New insights into malaria pathogenesis, drug resistance, epidemiology, and evolution. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-19>
- Sulzer, A. J., Wilson, M., & Hall, E. C. (1969). Indirect fluorescent-antibody tests for parasitic diseases. V. An evaluation of a thick-smear antigen in the IFA test for malaria antibodies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1969.18.199>
- Swan, H., Sloan, L., Muyombwe, A., Chavalitshe-winkoon-Petmitr, P., Krudsood, S., Leowattana, W.,

- Wilairatana, P., Looareesuwan, S., & Rosenblatt, J. (2005). Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of malaria in patients from Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.73.850>
- Swearingen, K. E., Lindner, S. E., Shi, L., Shears, M. J., Harupa, A., Hopp, C. S., Vaughan, A. M., Springer, T. A., Moritz, R. L., Kappe, S. H. I., & Sinnis, P. (2016). Interrogating the Plasmodium Sporozoite Surface: Identification of Surface-Exposed Proteins and Demonstration of Glycosylation on CSP and TRAP by Mass Spectrometry-Based Proteomics. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005606>
- Ta, T. H., Hisam, S., Lanza, M., Jiram, A. I., Ismail, N., & Rubio, J. M. (2014). First case of a naturally acquired human infection with Plasmodium cynomolgi. *Malaria Journal*. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-68>
- Tangpukdee, N., Duangdee, C., Wilairatana, P., & Krudsood, S. (2009). Malaria diagnosis: A brief review. In *Korean Journal of Parasitology*. <https://doi.org/10.3347/kjp.2009.47.2.93>
- Tarimo, D. S., Minjas, J. N., & Bygbjerg, I. C. (2001). Malaria diagnosis and treatment under the strategy of the integrated management of childhood illness (IMCI): Relevance of laboratory support from the rapid immunochromatographic tests of ICT malaria P.f/P.v and OptiMal. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. <https://doi.org/10.1080/13648590120068971>
- Theisen, M., Jore, M. M., & Sauerwein, R. (2017). Towards clinical development of a Pfs48/45-based transmission blocking malaria vaccine. In *Expert Review of Vaccines*. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1276833>
- Thomas, M. B., & Read, A. F. (2007). Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1638>
- Tilley, L., Straimer, J., Gnädig, N. F., Ralph, S. A., & Fidock, D. A. (2016). Artemisinin Action and Resistance in Plasmodium falciparum. In *Trends in Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.05.010>
- Trampuz, A., Jereb, M., Muzlovic, I., & Prabhu, R. M. (2003). Clinical review: Severe malaria. In *Critical Care*. <https://doi.org/10.1186/cc2183>
- Trenholme, G. M., Williams, R. L., Desjardins, R. E., Frischer, H., Carson, P. E., Rieckmann, K. H., & Canfield, C. J. (1975). Mefloquine (WR 142,490) in the treatment of human malaria. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1105787>
- Tse, E. G., Korsik, M., & Todd, M. H. (2019). The past, present and future of anti-malarial medicines. In *Malaria Journal*. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2724-z>
- Venkatraman, N., Tiono, A., Bowyer, G., Powlson, J., Collins, K., Coulibaly, S., Datto, M., Silman, D., Ouedraogo, A., Nebie, I., Imoukhuede, E., Brod, F., Folegatti, P., Dickinson, E., Jamieson, S., Bougouma, E., Wright, D., Bellamy, D., Diarra, A., ... Hill, A. (2019). Phase I assessments of first-in-human administration of a novel malaria anti-sporozoite vaccine candidate, R21 in matrix-M adjuvant, in UK and Burkina Faso volunteers. *MedRxiv*. <https://doi.org/10.1101/19009282>
- Vennerstrom, J. L., Ellis, W. Y., Ager, A. L., Andersen, S. L., Gerena, L., & Milhous, W. K. (1992). Bisquinolines. 1. N,N-Bis(7-chloroquinolin-4-yl)alkanediamines with Potential against Chloroquine-Resistant Malaria. *Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jm00089a025>
- Vo, T. K. D., Bigot, P., Gazin, P., Sinou, V., De Pina, J. J., Huynh, D. C., Fumoux, F., & Parzy, D. (2007). Evaluation of a real-time PCR assay for malaria diagnosis in patients from Vietnam and in returned travellers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.

<https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.09.004>

- Walk, J., Reuling, I. J., Behet, M. C., Meerstein-Kessel, L., Graumans, W., van Gemert, G. J., Siebelink-Stoter, R., van de Vegte-Bolmer, M., Janssen, T., Teelen, K., de Wilt, J. H. W., de Mast, Q., van der Ven, A. J., Diez Benavente, E., Campino, S., Clark, T. G., Huynen, M. A., Hermesen, C. C., Bijker, E. M., ... Sauerwein, R. W. (2017). Modest heterologous protection after *Plasmodium falciparum* sporozoite immunization: A double-blind randomized controlled clinical trial. *BMC Medicine*. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0923-4>
- Wang, J., Zhang, C. J., Chia, W. N., Loh, C. C. Y., Li, Z., Lee, Y. M., He, Y., Yuan, L. X., Lim, T. K., Liu, M., Liew, C. X., Lee, Y. Q., Zhang, J., Lu, N., Lim, C. T., Hua, Z. C., Liu, B., Shen, H. M., Tan, K. S. W., & Lin, Q. (2015). Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms10111>
- Warhurst, D. C., & Williams, J. E. (1996). Laboratory diagnosis of malaria. *Journal of Clinical Pathology*. <https://doi.org/10.1136/jcp.49.7.533>
- Weiss, G. E., Crabb, B. S., & Gilson, P. R. (2016). Overlaying Molecular and Temporal Aspects of Malaria Parasite Invasion. In *Trends in Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.12.007>
- White, M., Amino, R., & Mueller, I. (2017). Theoretical Implications of a Pre-Erythrocytic *Plasmodium vivax* Vaccine for Preventing Relapses. In *Trends in Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.12.011>
- White, M. T., Verity, R., Griffin, J. T., Asante, K. P., Owusu-Agyei, S., Greenwood, B., Drakeley, C., Gesase, S., Lusingu, J., Ansong, D., Adjei, S., Agbenyega, T., Ogutu, B., Otieno, L., Otieno, W., Agnandji, S. T., Lell, B., Kremsner, P., Hoffman, I., ... Ghani, A. C. (2015). Immunogenicity of the RTS,S/AS01 malaria vaccine and implications for duration of vaccine efficacy: Secondary analysis of data from a phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00239-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00239-X)
- White, N. J. (2008). *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1086/524889>
- William, T., Rahman, H. A., Jelip, J., Ibrahim, M. Y., Menon, J., Grigg, M. J., Yeo, T. W., Anstey, N. M., & Barber, B. E. (2013). Increasing Incidence of *Plasmodium knowlesi* Malaria following Control of *P. falciparum* and *P. vivax* Malaria in Sabah, Malaysia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002026>
- Wongsrichanalai, C., Barcus, M. J., Muth, S., Sutamihardja, A., & Wernsdorfer, W. H. (2007). A review of malaria diagnostic tools: Microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.119>
- World Health Organization. (2012). *Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors*.
- World Health Organization. (2014). *Severe Malaria*. <https://doi.org/10.1111/tmi.12313>
- World Health Organization. (2015). *Global technical strategy for malaria 2016-2030*.
- World Health Organization. (2019a). *Model list of essential medicines (21st list)*.
- World Health Organization. (2019b). *World Malaria Report 2019*.
- Wu, Y., Ellis, R. D., Shaffer, D., Fontes, E., Malkin, E. M., Mahanty, S., Fay, M. P., Narum, D., Rausch, K., Miles, A. P., Aebig, J., Orcutt, A., Muratova, O., Song, G., Lambert, L., Zhu, D., Miura, K., Long, C., Saul, A., ... Durbin, A. P. (2008). Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs 25 formulated with montanide ISA 51. *PLoS ONE*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002636>

- Wykes, M. N., Horne-Debets, J. M., Leow, C. Y., & Karunaratne, D. S. (2014). Malaria drives T cells to exhaustion. In *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00249>
- Yusof, R., Lau, Y. L., Mahmud, R., Fong, M. Y., Jelip, J., Ngian, H. U., Mustakim, S., Mat Hussin, H., Marzuki, N., & Mohd Ali, M. (2014). High proportion of knowlesi malaria in recent malaria cases in Malaysia. *Malaria Journal*. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-168>
- Zhang, M., Wang, C., Otto, T. D., Oberstaller, J., Liao, X., Adapa, S. R., Udenze, K., Bronner, I. F., Casandra, D., Mayho, M., Brown, J., Li, S., Swanson, J., Rayner, J. C., Jiang, R. H. Y., & Adams, J. H. (2018). Uncovering the essential genes of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by saturation mutagenesis. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aap7847>
- Zheng, X. Y., Xia, Y., Gao, F. H., & Chen, C. (1979). Synthesis of 7351, a new antimalarial drug (author's transl). *Acta Pharmaceutica Sinica*.
- Zimmerman, P. A., Ferreira, M. U., Howes, R. E., & Mercereau-Puijalon, O. (2013). Red Blood Cell Polymorphism and Susceptibility to *Plasmodium vivax*. In *Advances in Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407826-0.00002-3>
- Zimmerman, P. A., Mehlotra, R. K., Kasehagen, L. J., & Kazura, J. W. (2004). Why do we need to know more about mixed *Plasmodium* species infections in humans? In *Trends in Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.07.004>